



Facultad de Ciencias  
Dpto. Biología

## TESIS DOCTORAL

# Genes asociados a displasias esqueléticas. Diagnóstico e implicación en el asesoramiento genético (1998-2012)

María del Mar Fenollar Cortés  
Madrid, 2015





La Dra. M<sup>a</sup> José Trujillo Tiebas, adjunta del servicio de genética de la Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada *Genes asociados a displasias esqueléticas. Diagnóstico e implicación en el asesoramiento genético*, que presenta D<sup>a</sup> María del Mar Fenollar Cortés para obtener el Grado de Doctor, ha sido realizada bajo mi dirección, autorizándola para su presentación al Tribunal Calificador.

Madrid, 19 de octubre de 2015

Firmado:

Firmado:

Directora de la Tesis  
Dra. M<sup>a</sup> José Trujillo Tiebas

Tutor de la Tesis  
Dr. José Fernández Piqueras

**Fundación Jiménez Díaz**

Avda. de los Reyes Católicos, 2 - 28040 Madrid - España  
Tel. +34 91 550 48 00 Fax. +34 91 544 36 25 [fjd@fjd.es](mailto:fjd@fjd.es) [www.fjd.es](http://www.fjd.es)

C.I.F. U-83633859





A todas las mujeres trabajadoras, valga la redundancia



La primera persona a la que quisiera mostrar mi agradecimiento es a la Dra. Susi Lautre Ecenarro. Fue ella quien me enseñó las primeras nociones de citogenética. También fue ella quien me enseñó que podía ser mujer y genetista. Sus críticas sinceras al leer el primer borrador de esta tesis me supusieron más horas de trabajo pero mejoraron el resultado final.

La segunda persona a la que quiero mostrar mi agradecimiento es a la Dra. M<sup>a</sup> José Trujillo Tiebas, Aco, que me contagió su pasión por la genética molecular. Es muy de agradecer la confianza y el ánimo que puso en mí, dadas mis circunstancias, para realizar esta tesis doctoral que vio desde el primer momento.

Junto con Aco conocí a Jesús Gallego Merlo, que me enseñó entre risas a ser técnico del laboratorio de genética molecular, que a la postre ha resultado francamente beneficioso. Si Jesús me enseñó a mí yo contribuí a enseñar a Camilo Vélez Monsalve, que llegó después y me ayudó mucho a terminar la parte de laboratorio de la tesis.

No hubiese podido terminar este trabajo sin la complicidad y ayuda de mis amigas y compañeras de sección, la Dra. Carmen Cotarelo Pérez y la Dra. Raluca Oancea Ionescu. Siempre me han apoyado y animado a continuar. También agradezco a Amparo su sonrisa perenne y a Paco su presencia.

Otra gran mujer en la genética es la Dra. Carmen Ramos Corrales, coetánea de la Dra. Lautre Ecenarro. Si Susi me dijo que había que enfocar la tesis de otra forma, Carmen me ayudó a encontrar el modo de hacerlo. Siempre con cariño y siempre dedicándome el tiempo que requería.

Agradecer a la Dra. Carmen Ayuso García que me abriera las puertas del servicio de Genética Clínica de la Fundación Jiménez Díaz y diese su aprobación a que desarrollara estas tesis.

Dado lo ajustado de los márgenes de tiempo con los que he estado yendo y viniendo desde mi hospital al laboratorio de la Fundación Jiménez Díaz, quiero agradecer la ayuda, atención y preferencia que me ha mostrado todo el extenso personal del laboratorio de la FJD a lo largo de estos nueve años. Mi más sincera gratitud.

No creo que lo lean nunca, pero quiero dejar constancia de mi gratitud a los profesionales de la biblioteca del Hospital Clínico San Carlos, que no hay artículo que no me hayan conseguido siempre en tiempo récord.

Fuera del ámbito profesional hay muchas personas a las que tengo que agradecer su compañía, paciencia y ayuda. Sin ellas habría sido imposible dedicarle a esta tesis el tiempo que ha requerido. Y no quiero dejar de expresar mi gratitud a estas personas que sinceramente me quieren. Como dijo mi padre en los agradecimientos de su tesis: «es hermoso saber que estáis ahí y que sepáis lo que os quiero decir al oído».



**índice**



# Índice

<b>0. Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
1.1. Displasias esqueléticas.....	7
1.1.1. Craneosinostosis.....	10
1.1.2. Talla baja .....	11
1.1.2.1. Talla baja idiopática.....	13
1.2. Genes implicados en las alteraciones óseas.....	13
1.2.1. Receptores del factor de crecimiento de fibroblastos.....	13
1.2.1.1. Gen <i>FGFR3</i> . Patologías asociadas: formas letales y no letales.....	17
1.2.1.1.1. Formas letales: displasias tanatofóricas.....	17
1.2.1.1.2. Formas no letales: acondroplasia, hipocondroplasia, SADDAN, craneosinostosis (síndrome de Muenke).....	18
1.2.1.2. Gen <i>FGFR2</i> . Patologías asociadas: síndrome de Apert y síndrome de Crouzon.....	22
1.2.2. Gen <i>COMP</i> . Patologías asociadas: pseudoacondroplasia y displasia epifisaria múltiple.....	23
1.2.3. Gen <i>SLC26A2</i> . Patologías asociadas: acondrogénesis tipo 1B, atelosteofénesis sever tipo 2, displasia diastrófica y displasia epifisaria múltiple tipo 4 o recesiva.....	25
1.2.4. Gen <i>RMRP</i> . Patologías asociadas: hipoplasia de pelo-cartílago, displasia anauxética y displasia metafisaria sin hipotricosis.....	27
1.2.5. Gen <i>SHOX</i> . Patologías asociada: discondrosteosis de Léri-Weill, displasia mesomélica de Langer y talla baja idiopática.....	30
1.3. El asesoramiento o consejo genético.....	33
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>37</b>
<b>3. Pacientes y métodos.....</b>	<b>41</b>
3.1. Pacientes estudiados.....	43
3.1.1. Restos abortivos.....	44
3.1.2. Estudios prenatales.....	46
3.1.3. Estudios postnatales.....	49
3.1.3.1. Gen <i>FGFR3</i> : Estudio de acondroplasia, hipocondroplasia, displasia tanatofórica y craneosinostosis (síndrome de Muenke).....	49
3.1.3.2. Gen <i>FGFR2</i> : Estudio del síndrome de Apert y de Crouzon.....	49
3.1.3.3. Gen <i>COMP</i> : Estudio de pseudoacondroplasia.....	50
3.1.3.4. Gen <i>SLC26A2</i> : Estudio de displasia epifisaria múltiple recesiva.....	50
3.1.3.5. Gen <i>RMRP</i> : Estudio de hipoplasia de pelo-cartílago.....	50
3.1.3.6. Gen <i>SHOX</i> : Estudio de discondrosteosis de Léri-Weill, displasia mesomélica de Langer y talla baja idiopática:.....	50
3.2. Métodos.....	52
3.2.1. Manejo clínico: escala de Rappold.....	52
3.2.2. Obtención de muestra y extracción de ADN.....	53
3.2.2.1. Restos abortivos.....	53
3.2.2.1.1. Restos abortivos frescos.....	53

3.2.2.1.2. Restos abortivos parafinados.....	53
3.2.2.2. Estudios prenatales.....	54
3.2.2.2.1. Vellosoidad corial.....	54
3.2.2.2.2. Líquido amniótico (amniocitos).....	54
3.2.2.2.3. Cultivo celular.....	55
3.2.2.2.4. ADN fetal a partir de plasma materno.....	55
3.2.2.3. Estudios postnatales.....	55
3.2.2.3.1. Sangre periférica.....	55
3.2.2.3.2. Células bucales.....	55
3.2.3. Cuantificación de ADN.....	56
3.2.4. Estudios realizados.....	56
3.2.4.1. Restos abortivos.....	56
3.2.4.2. Estudios prenatales.....	57
3.2.4.3. Estudios postnatales.....	58
3.2.4.3.1. Gen <i>FGFR3</i> .....	58
3.2.4.3.2. Gen <i>FGFR2</i> .....	58
3.2.4.3.3. Gen <i>COMP</i> .....	58
3.2.4.3.4. Gen <i>SLC26A2</i> .....	59
3.2.4.3.5. Gen <i>RMRP</i> .....	59
3.2.4.3.6. Gen <i>SHOX</i> .....	59
3.2.5. Técnica moleculares: análisis directos.....	60
3.2.5.1. Secuenciación sanger.....	60
3.2.5.1.1. Gen <i>FGFR3</i> .....	61
3.2.5.1.2. Gen <i>FGFR2</i> .....	65
3.2.5.1.3. Gen <i>COMP</i> .....	66
3.2.5.1.4. Gen <i>SLC26A2</i> .....	68
3.2.5.1.5. Gen <i>RMRP</i> .....	69
3.2.5.1.6. Gen <i>SHOX</i> .....	69
3.2.5.2. MLPA.....	71
3.2.5.3. Minisequenciación.....	75
3.2.5.4. PCR a tiempo real y análisis por alta resolución de fusión ( <i>High Resolution Melting</i> ).....	75
3.2.6. Técnicas moleculares: análisis indirecto.....	76
3.2.6.1. Microsatélites.....	76
3.2.6.1.1. Gen <i>SLC26A2</i> .....	76
3.2.6.1.2. Gen <i>SHOX</i> .....	77
3.2.7. Estadística.....	78
3.2.8. Herramientas bioinformáticas.....	78

## 4. Resultados.....81

4.1. Restos abortivos.....	83
4.1.1. Resultados positivos para el gen <i>FGFR3</i> .....	85
4.1.2. Resultados negativos para el gen <i>FGFR3</i> .....	86
4.2. Estudios prenatales.....	87
4.2.1. Gen <i>FGFR3</i> .....	87
4.2.1.1. Alteraciones ecográficas fetales en la gestación en curso.....	88
4.2.1.1.1. Resultados prenatales positivos para el gen <i>FGFR3</i> .....	91
4.2.1.1.1.1. El diagnóstico prenatal no invasivo .....	92
4.2.1.1.2. Resultados prenatales negativos para el gen <i>FGFR3</i> .....	93



4.2.1.2. Estudio por un antecedente familiar en mayor o menor grado de parentesco y con estudio molecular positivo.....	95
4.2.1.3. Estudio por un antecedente familiar sin diagnóstico molecular confirmatorio.....	96
4.2.2. Gen <i>RMRP</i> .....	97
4.2.3. Gen <i>SHOX</i> .....	97
4.3. Estudios postnatales.....	99
4.3.1. Gen <i>FGFR3</i> : acondroplasia, hipocondroplasia, displasia tanatofórica y síndrome de Muenke.....	99
4.3.1.1. Resultados positivos.....	99
4.3.1.1.1. Polimorfismos.....	105
4.3.1.2. Resultados negativos para el gen <i>FGFR3</i> .....	107
4.3.1.3. La edad paterna.....	112
4.3.2. Gen <i>FGFR2</i> : síndrome de Apert y de Crouzon.....	113
4.3.2.1. Resultados para el gen <i>FGFR2</i> .....	113
4.3.3. Gen <i>COMP</i> : pseudoacondroplasia.....	114
4.3.3.1. Resultados para el gen <i>COMP</i> .....	114
4.3.4. Gen <i>SLC26A2</i> : displasia epifisaria múltiple.....	117
4.3.4.1. Resultados para el gen <i>SLC26A2</i> .....	117
4.3.5. Gen <i>RMRP</i> : hipoplasia de pelo-cartílago.....	123
4.3.5.1. Resultados para el gen <i>RMRP</i> .....	123
4.3.6. Gen <i>SHOX</i> : discondrosteosis de Léri-Weill, displasia mesomélica de Langer y talla baja idiopática.....	126
4.3.6.1. Resultados positivos para el gen <i>SHOX</i> .....	126
4.3.6.1.1. Grupo <i>FGFR3</i> .....	129
4.3.6.1.2. Grupo <i>IE</i> .....	134
4.3.6.1.3. Grupo <i>RAPPOLD</i> .....	138
4.3.6.1.3.1. Valoración de la escala de Rappold.....	145
4.3.6.1.4. Grupo <i>OTROS</i> .....	146
4.3.6.1.5. Grupo <i>HCSC</i> .....	151
4.3.6.2. Resultados del control de calidad EMQN.....	154

## 5. Discusión.....157

5.1. Restos abortivos.....	159
5.1.1. Resultados positivos.....	159
5.1.2. Resultados negativos.....	162
5.1.3. Asesoramiento genético.....	165
5.2. Estudios prenatales.....	167
5.2.1. Gen <i>FGFR3</i> .....	167
5.2.1.1. Alteraciones en la gestación en curso.....	167
5.2.1.1.1. Resultados prenatales positivos para el gen <i>FGFR3</i> .....	167
5.2.1.1.1.1. El diagnóstico prenatal no invasivo.....	169
5.2.1.1.2. Resultados prenatales negativos.....	170
5.2.1.2. Estudio por un antecedente familiar en mayor o menor grado de parentesco y con estudio molecular positivo.....	175
5.2.1.3. Estudio por un antecedente familiar sin diagnóstico molecular confirmatorio.....	176
5.2.1.4. Asesoramiento genético.....	177
5.2.2. Gen <i>RMRP</i> .....	180
5.2.2.1. Asesoramiento genético.....	180

5.2.3. Gen <i>SHOX</i> .....	180
5.2.3.1. Asesoramiento genético.....	180
5.3. Estudios postnatales.....	182
5.3.1. Gen <i>FGFR3</i> : acondroplasia, hipocondroplasia, displasia tanatofórica y síndrome de Muenke.....	182
5.3.1.1. Resultado positivos.....	182
5.3.1.1.1. Polimorfismos.....	183
5.3.1.2. Sensibilidad de la metodología utilizada para el gen <i>FGFR3</i> .....	185
5.3.1.3. Resultados negativos para el gen <i>FGFR3</i> .....	187
5.3.1.4. La edad paterna.....	190
5.3.1.5. Asesoramiento genético.....	190
5.3.2. Gen <i>FGFR2</i> : síndrome de Apert y Crouzon.....	192
5.3.2.1. Resultados para el gen <i>FGFR2</i> .....	192
5.3.2.2. Sensibilidad de la metodología utilizada para el gen <i>FGFR2</i> .....	193
5.3.2.3. Asesoramiento genético.....	195
5.3.3. Gen <i>COMP</i> : pseudoacondroplasia.....	195
5.3.3.1. Resultados para el gen <i>COMP</i> .....	195
5.3.3.2. Sensibilidad de la metodología utilizada para el gen <i>COMP</i> .....	197
5.3.3.3. Asesoramiento genético.....	198
5.3.4. Gen <i>SLC26A2</i> : displasia epifisaria múltiple recesiva.....	198
5.3.4.1. Resultados para el gen <i>SLC26A2</i> .....	198
5.3.4.2. Asesoramiento genético.....	204
5.3.5. Gen <i>RMRP</i> : hipoplais de pelo-cartílago.....	205
5.3.5.1. Resultados para el gen <i>RMRP</i> .....	205
5.3.5.2. Sensibilidad de la metodología utilizada para el gen <i>RMRP</i> .....	206
5.3.5.3. Asesoramiento genético.....	205
5.3.6. Gen <i>SHOX</i> : discondreosteosis de Léri-Weil, displasia mesomélica de Langer y talla baja idiopática.....	208
5.3.6.1. Resultados genéticos positivos del gen <i>SHOX</i> .....	208
5.3.6.1.1. Deleciones en el gen <i>SHOX</i> .....	208
5.3.6.1.2. Duplicaciones en el gen <i>SHOX</i> .....	210
5.3.6.1.3. Mutaciones puntuales en el gen <i>SHOX</i> .....	211
5.3.6.2. Presentación clínica de los pacientes positivos para el gen <i>SHOX</i> .....	211
5.3.6.3. Grupo <i>FGFR3</i> .....	212
5.3.6.3.1. Justificación del estudio del gen <i>SHOX</i> en el grupo <i>FGFR3</i> .....	214
5.3.6.4. Grupo IE.....	216
5.3.6.5. Grupo RAPPOLD.....	218
5.3.6.5.1. Valoración de la escala de Rappold.....	219
5.3.6.6. Grupo OTROS.....	221
5.3.6.7. Grupo HCSC.....	224
5.3.6.8. Asesoramiento genético.....	225
5.4. El asesoramiento genético: aspectos generales.....	227

## 6. Conclusiones.....229

## 7. Bibliografía.....237

## 8. Artículos publicados relacionados con la tesis. 265

# **0. resumen**



## 0. Resumen

Las displasias esqueléticas son un amplio campo de estudio que requiere unidades disciplinares de las distintas especialidades involucradas en su desarrollo. Esta tesis, basada en un trabajo principalmente asistencial, ha intentado dar respuesta al mayor número de demandas solicitantes de displasias esqueléticas recogidas en dos periodos: desde su inicio a 2006, y tras la concesión de un proyecto específico, de 2007 a 2012. En ese intento se han puesto a punto nuevos genes y nuevas herramientas diagnósticas que han permitido caracterizar mutaciones familiares que han facilitado la realización de un asesoramiento genético individual, familiar y reproductivo, fin último del estudio genético.

Ante alteraciones ecográficas el gen *FGFR3* juega un papel importante en el diagnóstico, con una sensibilidad de hasta el 60% en los fetos con hipoplasia torácica y micromelia. El estudio de las craneosinostosis aisladas sindrómicas requiere de un primer cribado del exón 7 del gen *FGFR3* así como de los exones 7 y 8 del gen *FGFR2*, seguido de la aplicación de la secuenciación masiva en una segunda aproximación diagnóstica.

El estudio de la talla baja disarmónica requiere de la secuenciación seriada del gen *FGFR3*, gen *SHOX* y gen *COMP*. Existen otras tallas bajas disarmónicas con fenotipos característicos reconocibles que dirigen el estudio molecular de forma concreta (genes *RMRP* y *COMP*). La puesta a punto del gen *SLC26A2* se realizó ante un resultado molecular no concluyente en una pareja y su hija afecta.

El estudio de la talla baja idiopática se centra en las alteraciones en el gen *SHOX*. La selección de los pacientes y la aplicación de una escala clínica que cribe los pacientes a estudio es necesaria para optimizar recursos y expectativas diagnósticas.

Una buena exploración y recogida de datos, así como dar una explicación detallada de las alteraciones encontradas, es un requisito imprescindible para orientar el estudio molecular y, ante un primer resultado negativo, tener la información para poder proponer otros diagnósticos diferenciales. Esta premisa es independiente de la técnica molecular que se utilice: desde la robusta y conocida secuenciación de sanger hasta las nuevas herramientas diagnósticas de secuenciación masiva.



# **1. introducción**





# 1. Introducción

El esqueleto humano es el conjunto de piezas óseas que, junto a ligamentos, tendones, músculos y cartílagos, proporcionan al cuerpo sostén mecánico y dinámico para el movimiento, contención y protección de los órganos internos y participa en la homeostasis mediante el intercambio de sales de calcio y fosfato. Constituido por más de 200 huesos en el adulto, se divide en el esqueleto axial (cabeza, columna vertebral y tórax) y el esqueleto apendicular (extremidades y cintura). El hueso está constituido por células vivas (osteoblastos y osteocitos) y material inerte (sales de calcio principalmente) en una continua renovación.

Se conocen numerosos genes que participan en la histogénesis del hueso. Las alteraciones en estos genes dan lugar a distintas patologías óseas con manifestaciones muy variadas: desde formas letales a formas que pasan desapercibidas. Pueden afectar a varios grupos de huesos, como el acortamiento rizomélico de las extremidades superiores e inferiores de la acondroplasia, o a regiones concretas, como el cráneo y el cierre prematuro de sus suturas. Una de las manifestaciones más comunes en las alteraciones óseas es la presentación de la talla baja, armónica o disarmónica.

## 1.1. DISPLASIAS ESQUELÉTICAS

Las **displasias esqueléticas**, u osteocondrodisplasias, constituyen un grupo extenso, heterogéneo y complejo de desórdenes del crecimiento de los huesos y cartílagos que resulta en un anormal tamaño y forma de los diferentes segmentos del esqueleto.

Las deformidades producidas serán progresivas ya que los genes mutados codifican proteínas que actúan sobre las zonas de crecimiento óseo que permanecen activas hasta el fin de la pubertad donde se termina el crecimiento óseo (Cortina Ors, 2015).

La prevalencia durante el embarazo es de 7,5 casos por 10.000 gestaciones (Weldner, 1985), mientras que la prevalencia al nacimiento es algo menor por la existencia de las formas letales prenatales y está estimada en 1 por 5.000 nacimientos, constituyendo el 5% de los desórdenes genéticos del periodo neonatal (Orioli, 1986).

Históricamente se han dividido en (Noel, 2014):

- Osteodisplasias: son malformaciones generalizadas del esqueleto. Se manifiestan en el periodo embrionario y presentan un fenotipo que evoluciona a lo largo de la vida.

- Condrodisplasias: son anomalías en el desarrollo del cartílago. Igual que el anterior se manifiesta en el periodo embrionario evolucionando en el periodo postnatal.
- Disostosis: son desórdenes individuales o específicos de grupos de huesos debidos a errores en la blastogénesis que se manifiestan en el periodo embriogénico y se mantienen estables durante toda la vida.

En la práctica esta clasificación es insuficiente y confusa. La clasificación de las displasias esqueléticas se ha revisado numerosas veces en las últimas cuatro décadas. La última revisión, de 2010, enumera 456 entidades divididas en 40 categorías definidas por la combinación del estudio molecular, bioquímico y radiográfico. Trescientas dieciseis de estas entidades son debidas a mutaciones en 226 genes conocidos, por lo que el diagnóstico molecular juega un papel muy importante en la clasificación de las displasias esqueléticas (Warman, 2011).

A continuación, se muestran las 40 categorías:

En función de un gen o ruta específica

1. Condrodisplasias *FGFR3*
2. Colágeno tipo 2 y relacionados
3. Colágeno tipo 11
4. Trastornos de sulfatación
5. Perlecan (proteoglicano de heparán-sulfato de la MEC\*)
6. Agrecan (proteoglicano de la MEC\*)
7. Filamina y relacionados
8. TRPV4 (familia de los canales iónicos)

En función de las alteraciones radiológicas

9. Displasias con costillas cortas (con o sin polidactilia)
10. Displasias epifisaria múltiple y pseudocondroplasia
11. Displasias metafisarias
12. Displasias espondilometafisarias
13. Displasias espondiloepimetafisarias
14. Displasias espondilo displásicas severas
15. Displasias acromélicas
16. Displasias acromesomélicas
17. Displasias mesomélicas y rizo-mesomélicas

Por alteración macroscópica con significado clínico

18. Displasias con huesos curvos
19. Displasias con huesos delgados/finos
20. Displasias con luxación articular múltiple

En función de la mineralización

21. Condrodisplasia *punctata*
22. Displasias osteoscleróticas neonatales
23. Densidad ósea aumentada (sin alteración de la configuración ósea)
24. Densidad ósea aumentada con compromiso metafisario y/o diafisario
25. Osteogénesis imperfecta y densidad ósea disminuida
26. Mineralización anormal
28. Osteolisis

Metabolopatías lisosomales con alteraciones esqueléticas

27. Enfermedad de depósito lisosomas con compromiso esquelético (múltiples disostosis)

Alteraciones anormales en el desarrollo del hueso

29. Desarrollo esquelético desorganizado

Síndromes de sobrecrecimiento con alteraciones esqueléticas

30. Síndromes de sobrecrecimiento con compromiso esquelético

Enfermedades inflamatorias con compromiso esquelético

31. Osteoartropatías genéticas inflamatorias/similares a artritis reumatoide

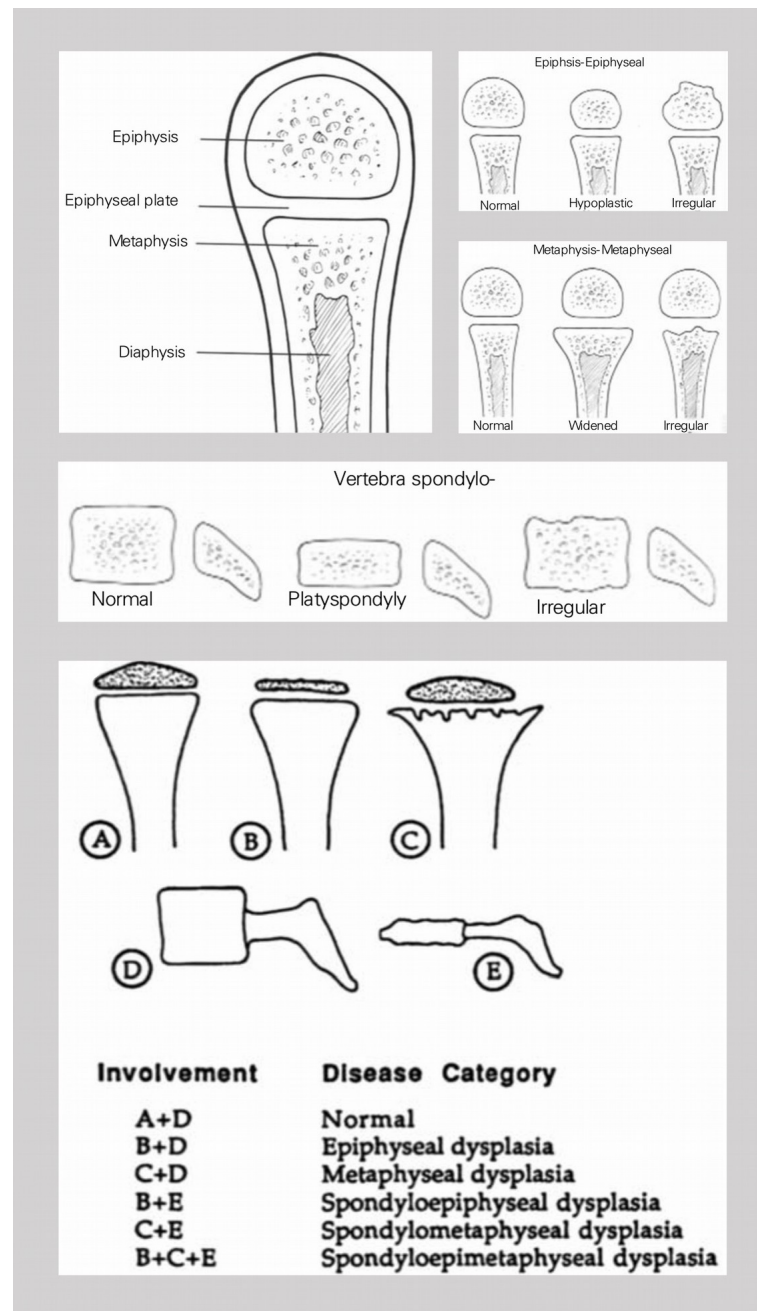
Disostosis y criterio anatómico afectado

32. Displasia cleidocraneal y defectos de osificación craneal aislados
33. Craneosinostosis sindrómicas
34. Disostosis con compromiso craneofacial predominante
35. Disostosis con compromiso vertebral y no costal predominante
36. Disostosis rotulianas
37. Braquidactilias (con o sin manifestación extraesquelética)
38. Defectos de reducción-hipoplasia de extremidades
39. Polidactilia-sindactilia-trifalangismo
40. Defectos en la formación articular y sinostosis

\*MEC: matriz extracelular del cartílago

En las osteocondrodisplasias se encuentran afectadas las epífisis, metáfisis y diáfisis de los huesos en un patrón generalizado que resulta frecuentemente en una talla baja desproporcionada (Kant, 2003). Pueden estar afectadas una o varias áreas del hueso en crecimiento y dan lugar a patrones radiológicos característicos como se observa en la **figura 1.1**

**Figura 1.1: Patrones radiológicos característicos de las displasias esqueléticas con compromiso de la talla**



### 1.1.1. Craneosinostosis

Dentro de la última nosología de los desórdenes del esqueleto realizada en 2010, los últimos grupos están clasificados por criterio anatómico, es decir, cráneo, cara, columna vertebral, tórax y extremidades.

La **craneosinostosis** es el cierre prematuro de una, varias o todas las suturas coronarias. Comporta siempre una alteración en el volumen o en la morfología del cráneo y la cara que, en algunas ocasiones, provocan manifestaciones clínicas por la alteración de la función cerebral como son vómitos, cefaleas y déficit neurológicos, entre otros.

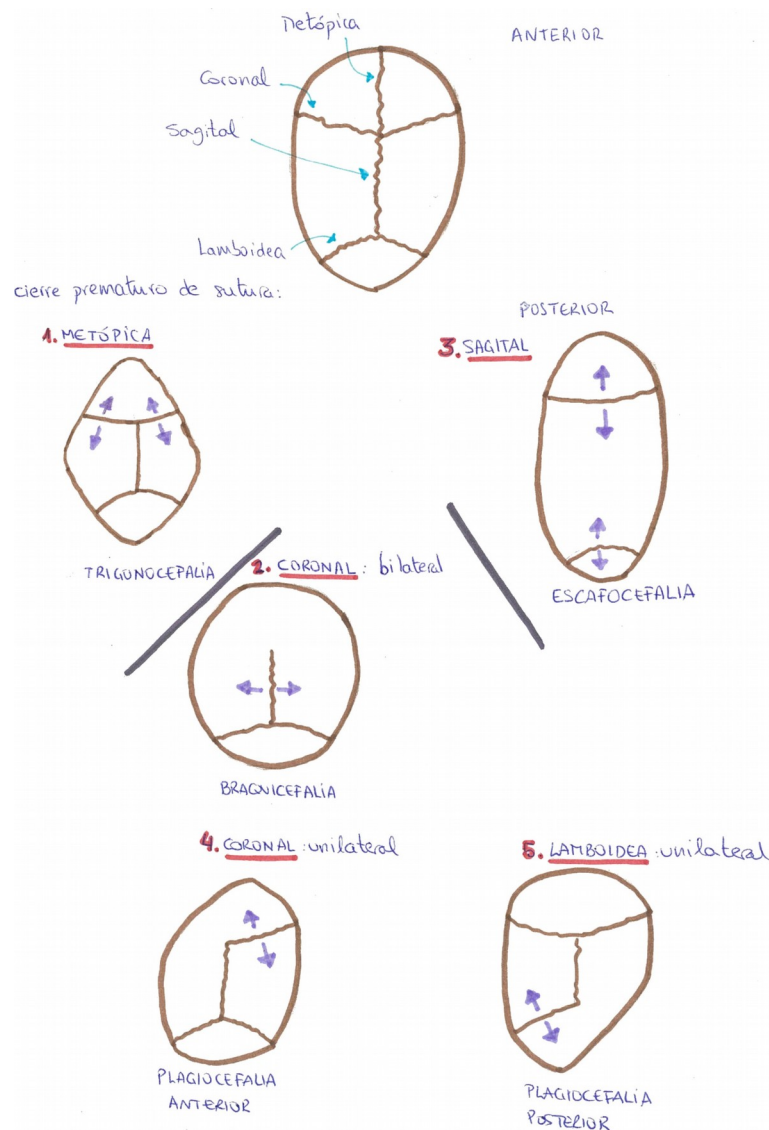
Presenta una frecuencia de 1 cada 2.500 individuos (Hunter, 1976 y 1977; La-jeunie, 1995 y 1996).

En la **figura 1.2** podemos observar un cráneo normal con sus suturas abiertas y las distintas patologías en función de la sutura que se cierra prematuramente. El crecimiento craneal en condiciones normales tiene lugar en sentido perpendicular a cada sutura. Cuando se cierra precozmente, este crecimiento es paralelo a la sutura provocando una alteración en la forma definitiva de la cabeza.

Por tanto, en función de la sutura afectada tenemos:

1. Escafocefalia o dolicocefalia: es el cierre precoz y exclusivo de la sutura sagital con crecimiento en paralelo a esa sutura. Como resultado tenemos una cabeza alargada en sentido anteroposterior que recuerda a un barco volcado. No produce hipertensión intracraneal y deriva en un problema esencialmente estético.
2. Braquicefalia: es el cierre precoz de la sutura coronal. Puede ocasionar exoftalmos, hipertelorismo, aplanamiento de la cara e incluso deficiencia mental. Si es unilateral el resultado es la plagiocefalia que es la deformidad asimétrica con aplanamiento del lado afectado y de la órbita ocular correspondiente con prominencia del lado indemne.
3. Trigonocefalia: cráneo en cuña. Resulta del cierre prematuro de la sutura frontal o metópica. La frente es estrecha y prominente y se aprecia hipertelorismo. Supone un problema exclusivamente estético.
4. Turricefalia: deformidad mixta con varias suturas afectadas. El crecimiento del cráneo es hacia arriba. Suelen describirse dos formas: oxicefalia, en la que el crecimiento es hacia la zona fontanelar, y la acrocefalia cuyo crecimiento es esférico. Ambas originan retraso mental y trastornos visuales por acodamiento del nervio óptico.

**Figura 1.2. Distintas craneosinostosis derivadas de los distintos cierres prematuros de las suturas craneales**



Las craneosinostosis se pueden dividir, en función de la etiología, en genéticas, que a su vez puede ser sindrómicas, no sindrómicas, cromosómicas, metabólicas y poligénicas; y en ambientales, que pueden ser mecánicas, microcefálicas y teratogénicas. Aproximadamente un 15% de las craneosinostosis son sindrómicas y de las no sindrómicas, el 50% son cierres prematuros de las suturas sagitales.

### 1.1.2. Talla baja

La talla de un individuo es el resultado de una compleja interacción entre múltiples genes y mecanismos epigenéticos modulados por factores ambientales, intrínsecos y extrínsecos, que ocurren a lo largo de todo el proceso de crecimiento del individuo.

Se define como talla baja aquella que presenta una altura inferior a 2 SDS corregida por edad, sexo, estadio de desarrollo puberal y raza (Ranke, 1996). Existe una clasificación internacional de la talla baja en función de la localización del desorden (Kant, 2003):

1. Primarios: defecto intrínseco en el hueso y/o tejido conectivo debido a un defecto genético o un daño peri/prenatal. Suelen presentar un fenotipo peculiar y estatura desproporcionada (aspecto disarmónico). Se incluyen: displasias óseas, errores del metabolismo del hueso, determinados síndromes cromosómicos y el retraso del crecimiento intrauterino (CIR) no recuperado.
2. Secundarios: debido a factores ajenos al hueso y al tejido conectivo que se traduce en un retraso en el crecimiento del hueso. Se incluyen alteraciones endocrinas, metabolopatías así como causas psicosociales e iatrogénicas.
3. Tallas bajas idiopáticas (TBI): todo aquello que no está incluido en lo anterior y es de causa desconocida.

El estudio de la talla baja es un vasto campo de posibilidades diagnósticas de difícil resolución ya que es debido a un amplio número de condiciones muy heterogéneas entre sí. El componente genético juega un papel crucial en los desórdenes de tipo primario, también es importante en los secundarios y probablemente en las TBI. Según se vayan describiendo nuevos genes se irá desgranando este grupo.

A su vez, los desórdenes en el crecimiento debido a causa genética (primarios) pueden clasificarse en cromosómicos, monogénicos y de etiología desconocida (**Tabla 1.1**; Kant, 2003).

**Tabla 1.1. Clasificación de los desórdenes en el crecimiento debido a causa genética (Kant, 2003)**

ORIGEN	TIPO	EJEMPLO
Cromosómico	numérico	Trisomía 21
	estructural	Síndrome de Williams
	mosaico	Síndrome de Pallister-Killian
	disomía uniparental	Síndrome de Silver-Russell
Monogénicas	displasias esqueléticas	Mutaciones en <i>FGFR3</i> , <i>RMRP</i> , <i>FGFR2</i> , <i>COMP</i> ...
	eje hormona de crecimiento	Mutaciones en <i>GHR</i>
	síndrome de inestabilidad cromosómica	Anemia de Fanconi
Otros de etiología desconocida		Síndrome de Kabuki

La talla baja es un motivo muy frecuente de consulta en la Endocrinología Pediátrica, que se evidencia más en niños que en niñas. La prevalencia es difícil de estimar pero se encuentra entre 9,1 y 26,2% (Kemp, 2005; Darendelien, 2007; García, 2009).

### 1.1.2.1. Talla baja idiopática

Para que un paciente tenga un diagnóstico final de TBI tiene que presentar las siguientes características clínicas (Wit, 2008; Carrascosa, 2011):

- Talla inferior a -2SDS de la media correspondiente a su población, edad y sexo, con la expectativa de alcanzar una talla adulta patológica (inferior a 2SDS). De esta forma quedan excluidos los retrasos constitucionales del crecimiento y del desarrollo (RCCD).
- Peso y talla al nacimiento por encima de -2SDS de la media corregida por edad gestacional y sexo. Es decir, sin retraso del crecimiento intrauterino.
- Proporciones corporales armónicas sin evidencia de alteraciones esqueléticas.
- Que se haya descartado por estudios seriados:
  - Alteraciones orgánicas: deficiencia de hormona de crecimiento, IGF-I...
  - Alteraciones en ingesta: malnutrición (celiaquía, infecciones...).
  - Trastornos psicosociales y afectivos graves.
  - Origen genético: cromosomopatías, desórdenes monogénicos (displasias esqueléticas, defectos en el eje hipotálamo-pituitaria-hormona de crecimiento...)

A su vez las TBI pueden ser familiares, si hay otros miembros de la familia afectados, o no familiares, si el *probandus* es el primer caso.

## 1.2. GENES IMPLICADOS EN LAS ALTERACIONES ÓSEAS

Entre todos los genes conocidos cuyas mutaciones se manifiestan en una displasia esquelética, esta tesis pretende abordar el estudio de los genes *FGFR3*, *FGFR2*, *COMP*, *SLC26A2*, *RMRP* y *SHOX*.

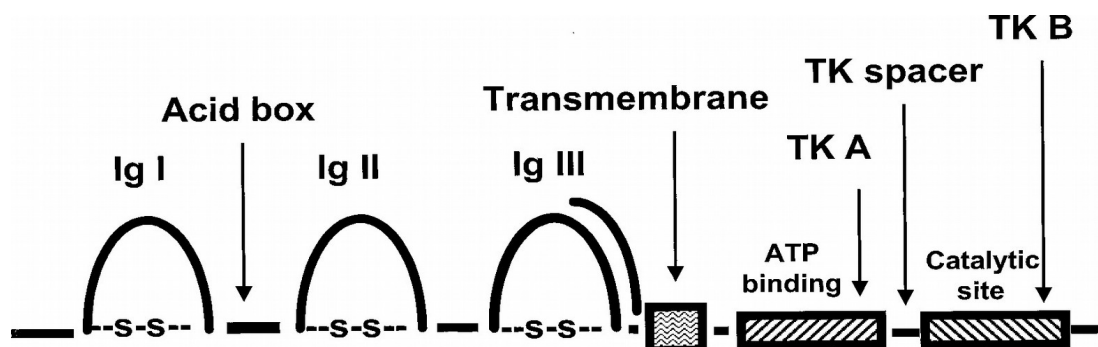
### 1.2.1. Receptores del factor de crecimiento de fibroblastos

Los receptores de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFRs) son proteínas transmembranales que pertenecen a los receptores de la familia tirosín-quinasa. Las siglas vienen de su nombre en inglés: *fibroblast growth factor receptor*. Se conocen 4 tipos cuyas secuencias de aminoácidos están muy conservadas



evolutivamente (Passos-Bueno, 1999). La estructura de los 4 tipos está formada por: una región extracelular con 3 dominios similares a la inmunoglobulina Ig (IgI, IgII e IgIII), una región transmembrana y una región citoplasmática con 2 dominios con actividad tirosín-quinasa (TK1 y TK2) (Burke, 1998) (**figura 1.3**). Estos receptores juegan un papel importante en el desarrollo de los miembros y de la región craneofacial (Naski, 1998; Passos-Bueno, 1999).

**Figura 1.3.**Diagrama esquemático de la proteína FGFR mostrando los distintos dominios (Vajo, 2000)



Los ligandos de estos receptores son los factores de crecimiento de fibroblastos, FGF por sus siglas en inglés (*fibroblast growth factor*) y se conocen, a fecha de hoy, 22 diferentes. Una vez unido el ligando a su receptor, éste dimeriza con la participación de proteoglicanos sulfatos heparán. Una vez formado el dímero, se autofosforilan los residuos de los dominios tirosín-quinasa citoplasmáticos lo que activa una cascada de señales que participan en el crecimiento y en la diferenciación de células mesenquimales y neuroectodérmicas (Spivak-Kroizman, 1994; Vajo, 2000). La unión del ligando al receptor produce diferentes respuestas celulares que se pueden dividir en dos periodos: el embrionario, donde juegan un papel crucial en la morfogénesis por su regulación en la proliferación, la diferenciación y la migración celular, y el adulto, donde participan en el sistema reparador de tejidos y de lesiones y en la angiogénesis tumoral (Eswarakumar, 2005).

Los genes de los 4 tipos de FGFR conocidos se encuentran localizados en distintos cromosomas:

- El gen *FGFR1* (MIM 615465): localizado en el brazo corto del cromosoma 8 (8p11.2). Constituido por 18 exones, donde el primer exón no codifica, y da lugar a una proteína de 822 aminoácidos. Las mutaciones en este gen dan lugar a distintas patologías entre las que destacan el síndrome de Pfeiffer, dentro de las displasias esqueléticas, y el hipogonadismo hipogonadotropo 2 con o sin anosmia.
- El gen *FGFR2* (MIM 176943): localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q26). Constituido por 18 exones, donde el primer exón no codifica,

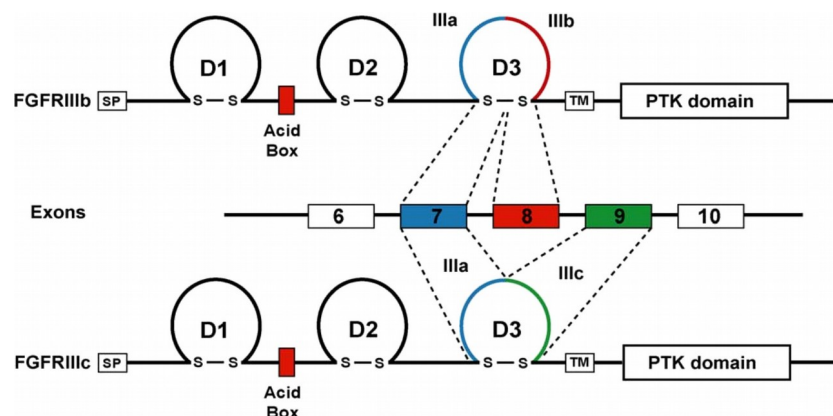


y da lugar a una proteína de 821 aminoácidos. Junto al *FGFR3* son los genes cuyas mutaciones están implicadas en el mayor número de displasias esqueléticas.

- El gen *FGFR3* (MIM 134934): localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Tiene una longitud de 16,5 kb, con 18 exones, el primero no codificante, formando una proteína de 808 aminoácidos. Fue caracterizado al buscar el gen causante de la enfermedad de Huntington, ya que se localizan muy próximos.
- El gen *FGFR4* (MIM 134935), localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q35.2). Como los anteriores, presenta 18 exones, el primero no codificante, para dar lugar a una proteína de 802 aminoácidos. Las mutaciones somáticas en este gen están relacionadas con la progresión del cáncer y la metástasis. No se han descrito mutaciones germinales para este gen (Wilkie, 2005).

Los genes *FGFR1*, 2 y 3 presentan dos isoformas que resultan de un procesamiento alternativo de modo que se obtiene una forma denominada “b”, de expresión principal en células epiteliales, y otra forma “c” de expresión principal en células mesenquimales. Éstas, a su vez, se unen a ligandos FGF distintos (**Figura 1.4**).

**Figura 1.4.** Isoformas de *FGFR3* generadas por procesamiento alternativo de los exones 7 y 8 según Eswarankumar, 2005: el exón 7 con el 8 resulta en *FGFRIIIb* y el exón 7 con el 9 resulta en *FGFRIIIc*.

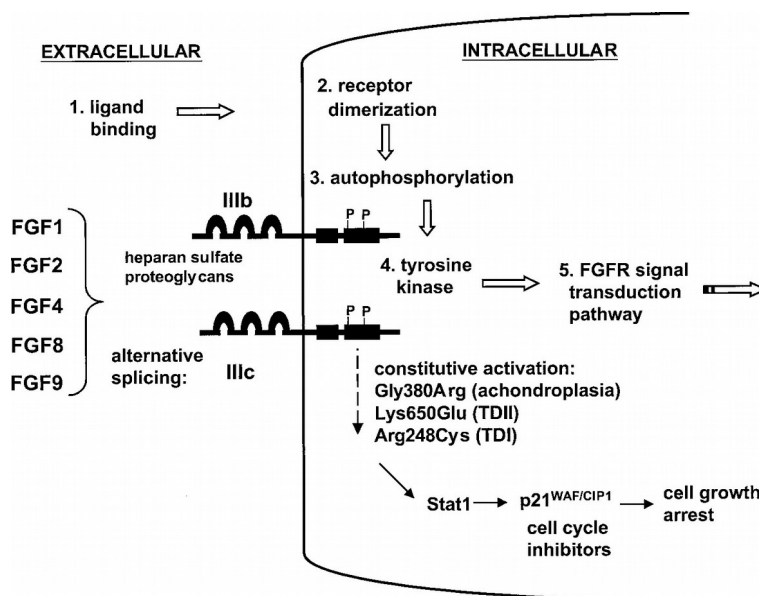


Algunas de las displasias esqueléticas más conocidas y las craneosinostosis sindrómicas más frecuentes son debidas a mutaciones en los genes *FGFR1*, 2 y 3. En función de dónde se produzca la mutación tenemos distintas categorías (Vajo, 2000; Eswarakumar, 2005; Wilkie, 2005):

1. Mutaciones en la región de unión entre los dominios II-IIIa inmunoglobulinas-like: Los estudios por cristalografía parecen indicar que se produce un aumento de la afinidad al ligando y una alteración en la especificidad

induciendo modificaciones en las células madre mesenquimales. Suele ser común la transformación de una prolina a arginina (Wilkie 2005). Ejemplos: en el gen *FGFR1*, el cambio p.Pro242Arg en el síndrome de Pfeiffer tipo I; en el gen *FGFR2*, el cambio p.Ser252Trp y p.Pro253Arg en el síndrome de Apert; y en el gen *FGFR3*, el cambio de p.Pro250Arg en el síndrome de Muenke. En todos ellos la manifestación principal es la craneosinostosis, más o menos severa, y la presencia o no de anomalías en las extremidades.

2. Mutaciones en dominio III Ig-like: la mayoría son mutaciones sin sentido en el que está implicada la ganancia o pérdida de un residuo de cisteína que provoca una activación continua del receptor. Son muy frecuentes en el gen *FGFR2*, donde se han descrito más de 50 mutaciones, pero no en el resto de los receptores (Wilkie, 2005).
3. Mutaciones en los dominios transmembranas: son especialmente frecuentes en el gen *FGFR3* pero poco frecuentes en el gen *FGFR2*. La acondroplasia, la forma más frecuente de displasia esquelética, es debido a una mutación en esta región en el gen *FGFR3* (p.Gly380Arg). En la **figura 1.5** se muestra el modelo propuesto de actuación silvestre y mutado.
4. Mutaciones en la región tirosín-quinasa citoplasmática: provocan la activación continua de este dominio independientemente de la presencia de ligando y, por tanto, una ganancia de función de la proteína que inhibe el crecimiento del hueso. La mutación en el codón 540 característica de la HCH se encuentra en esta región (Bellus, 1995).



**Figura 1.5** Modelo de actuación de la proteína *FGFR3* (números del 1 al 5). Y modelo de posible actuación cuando el receptor presenta una mutación (flecha discontinua). (Vajo, 2000)

### 1.2.1.1. Gen *FGFR3*. Patologías asociadas: formas letales y no letales

#### 1.2.1.1.1. Formas letales: displasias tanatofóricas

La displasia tanatofórica, junto a la osteogénesis imperfecta en sus distintos tipos pero fundamentalmente la 2 (MIM166210) y la acondrogénesis tipo 2 (MIM200610), son las displasias esqueléticas más frecuentemente diagnosticadas durante la ecografía prenatal, constituyendo el 40% de todos los casos prenatales (Krakow, 2008; Schramm, 2009).

La displasia tanatofórica fue descrita por primera vez en 1967 por Maroteaux (Maroteaux, 1967). Es la displasia esquelética letal más frecuente tanto en fetos como en neonatos (Bonaventure, 1996) con una incidencia de 1 en 20.000 a 1 en 60.000 nacidos (Wilcox, 1998; Vajo, 2000). Se caracteriza por una severa micromelia con rizomelia, longitud de tronco normal, tórax estrecho con costillas cortas, braquidactilia, cuerpos vertebrales marcadamente planos (platispondilia), pelvis pequeña, cabeza larga con frente prominente, hipertelorismo, ojos prominentes y puente nasal deprimido. La mineralización de los huesos es normal y no se ven fracturas. Pueden presentar craneosinostosis, frecuentemente el cráneo en trébol, que suele asociar holoprosencefalia, agenesia del cuerpo calloso y ventriculomegalia. Suele ser común que además presenten anomalías cardiovasculares y renales asociadas. La piel es gruesa con extremada redundancia. Así mismo un 50% de los casos presenta polihidramnios (Noel, 2014).

La mayoría fallecen en el periodo neonatal debido a la reducida cavidad torácica que provoca una hipoplasia pulmonar o a un fallo respiratorio derivado de un *foramen magnum* pequeño que provoca estenosis de las raíces nerviosas (Baker, 1997).

Se han clasificado en dos formas: por la presencia o ausencia de cráneo en forma de trébol (Taybi, 1996) y por la presencia de fémur recto o curvo (Langer, 1987). De tal manera que se describe una displasia tanatofórica tipo I (MIM187600), la más frecuente, que presenta los fémures curvados (a modo de auricular de teléfono antiguo) pero que no suele presentar craneosinostosis, rasgo que sí que aparece en la tipo II (MIM187601), con fémur recto (Noel, 2014).

Existen varias mutaciones descritas para la displasia tanatofórica tipo I que en su conjunto explican el 60% de los casos (Horton, 1983). Para la displasia tanatofórica tipo II sólo se conocen dos mutaciones: p.Lys650Glu y p.Ser249Cys, ambas descritas por Tavormina en 1995. Wilcox describió que todos los casos de displasia tanatofórica tipo II con mutación p.Lys650Glu presentaban fémur corto y recto y craneosinostosis, normalmente del tipo cráneo en trébol (Wilcox, 1998).

#### 1.2.1.1.2. Formas no letales: acondroplasia, hipocondroplasia, SADDAN, craneosinostosis (síndrome de Muenke).

La **acondroplasia** (ACH, MIM100800) es la forma más común de displasia esquelética no letal con una prevalencia de 1 cada 10.000-30.000 recién nacidos vivos (Stoll, 1989; Hicks, 2003). Se caracteriza por micromelia, rizomelia, moderado arqueamiento de miembros, braquidactilia con un característico aumento de la distancia interespacial entre los dedos 3º y 4º (mano en tridente), cabeza grande con frente abombada e hipoplasia media facial con tronco largo (Noel, 2014). No se encuentra afectada la inteligencia. Radiológicamente se caracteriza por (Spranger, 2002):

- Calota alargada con la región frontal, parietal y occipital prominentes.
- Espacio interpeduncular vertebral lumbar reducido, pedúnculos vertebrales cortos en imagen lateral, cuerpos vertebrales con forma de cubo, estenosis del canal lumbar.
- Huesos ilíacos planos con márgenes acetobulares horizontales.
- Huesos tubulares cortos con epífisis planas y metáfisis y diáfisis anchas.
- Desproporcionado acortamiento del húmero y peroné alargado.

El diagnóstico de fetos afectados de ACH no se produce hasta el tercer trimestre donde se aprecia la presencia de un fémur corto, junto a una mano en tridente y una frente abombada (Cordone, 1993). En ocasiones también puede observarse tórax estrecho y ligera incurvación de fémur.

El 98% de los casos está causado por la mutación c.1138G>A, p.Gly380Arg, en el gen *FGFR3* (Bellus, 1995; Superti-Furga, 1995). Suele ser esporádica y de origen paterno (Wilkin, 1998). Los pacientes con la mutación p.Gly380Arg en homocigosis presentan una displasia esquelética letal con hidrocefalia, anomalías cerebrales y fallo respiratorio por la estrecha caja torácica con hipoplasia pulmonar que provoca la muerte a los pocos días de nacer (Pauli, 1983).

La **hipocondroplasia** (HCH, MIM146000) presenta un fenotipo más leve que la ACH con acortamiento de extremidades, talla baja, lordosis lumbar y sin dismorfia facial. La prevalencia es de 1 cada 50.000 recién nacidos vivos (Hicks, 2003). Presenta una variabilidad fenotípica amplia donde pueden aparecer fenotipos en los que los signos solapan con pacientes con talla normal-baja armónica hasta otros más severos que recuerdan a la ACH. En la mayoría de los casos no aparecen los primeros síntomas de talla baja hasta bien entrada la infancia (Karadimas, 2006).

La clínica de HCH incluye talla baja con una altura final de 128-165cm a la edad adulta, tronco ligeramente alargado con piernas cortas, lordosis lumbar, macrocefalia, frente abombada, con manos y pies cortos y estrechos. Los hallazgos radiológicos incluyen (Spranger, 2002):

- Espacio interpeduncular vertebral lumbar moderadamente reducido, pedúnculos vertebrales cortos en imagen lateral y aumento de la concavidad dorsal de los cuerpos vertebrales.
- Moderado acortamiento de los huesos largos con metáfisis anchas y diáfisis cortas y anchas.
- El extremo distal del peroné está alargado en relación con la tibia.

En un principio esta enfermedad no asoció problemas neurológicos, sin embargo los últimos estudios indican que la HCH debido a la mutación p.Asn540Lys, a diferencia con la ACH, presenta unas anomalías cerebrales, principalmente, disgenesia del lóbulo temporal y occipital, que explicarían la presencia de epilepsia y de problemas en el aprendizaje o retraso intelectual que aparecen en la mitad de estos pacientes con esta mutación (Linnankivi, 2012; Philpott, 2013). Estos hallazgos parecen sugerir la importancia de este gen en el desarrollo y organización neuronal en el córtex temporo-occipital (Philpott, 2013).

El diagnóstico prenatal está muy poco documentado por las características clínicas más leves que la ACH y son muy escasas las publicaciones.

El 70% de los pacientes con HCH presentan la transversión C>A o C>G en el nucleótido 1620 dando lugar al cambio de asparagina por lisina en el codon 540, p.Asn540Lys, (Bellus, 1995; Prinos, 1995; Rousseau, 1994; Stenson, 2003). Están descritos pacientes que presentaban una doble mutación heterocigota: p.Arg380Gly, típica de ACH, junto a p.Asn540Lys, por presentar progenitores afectados de estas patologías. La clínica de estos pacientes era de anomalías cerebrales, retraso mental moderado y problemas respiratorios (Chitayat, 1999). También está descrita la mutación p.Asn540Lys en homocigosis con una clínica entre la ACH y la doble heterocigota ACH/HCH (De Rosa, 2014).

Las siglas **SADDAN** (*achondroplasia, severe, with developmental delay and acanthosis nigricans*, MIM616482) corresponden a pacientes que presentan acondroplasia severa con retraso en el desarrollo y *acanthosis nigricans* (presencia de una hiperqueratosis e hiperpigmentación que da un aspecto de piel engrosada y oscurecida). Descrito por primera vez en 1999 por Tavormina, presenta una clínica muy cercana a la displasia tanatofórica tipo I pero con tórax estrecho y un compromiso respiratorio no tan grave que les permite sobrevivir al nacimiento aunque debido a este compromiso presentan una alta morbi-mortalidad. Presentan un retraso mental de moderado a profundo. Están documentados pocos casos y la mayoría presentan la mutación original que encontró Tavormina: p.Lys650Met (Tavormina, 1999).

Las **craneosinostosis sindrómicas**, en función del gen implicado, se dividen en craneosinostosis relacionadas con el *FGFR* (el síndrome de Muenke, de Apert,

de Pfeiffer, de Crouzon, de Beare-Stevenson, de Jackson-Weiss, Crouzon con acanthosis y sinostosis coronal aisladas); el síndrome de Saethre-Chotzen (gen *TWIST1*), el síndrome de Carpenter (gen *RAB3*) y el síndrome craneofrontal (gen *EFBN1*). Las características principales de estos desórdenes están descritas en la **Tabla 1.2**. Pasamos a describir el síndrome de Muenke en este apartado y el Síndrome de Apert y de Crouzon en el apartado de mutaciones en el gen *FGFR2*.

El **síndrome de Muenke** (MIM 602849) fue descrito en 1997 por Maximilian Muenke en una serie de 20 pacientes que presentaban una sinostosis coronal bi o unilateral (Muenke, 1997). Los pulgares gordos de los pies suelen ser más anchos de lo normal. Radiológicamente suelen presentar malformaciones en las extremidades como falanges intermedias, fusión carpo-tarsal y epífisis en forma de cono. Pueden asociar pérdida auditiva en algún grado hasta en un 95% de los casos, y pueden presentar un retraso en el desarrollo (Doherty, 2007). La frecuencia está estimada en 1 de cada 30.000 recién nacidos vivos y representa el 8% de todos los casos de craneosinostosis (Boletín del ECEMC, serie V, nº6, 2007). El síndrome de Muenke es debido exclusivamente a la mutación c.749C>G que provoca el cambio de una prolina por arginina en el codon 250 del *FGFR3*, p.Pro250Arg. De hecho ésta es la mutación más frecuente en la craneosinostosis y su presencia da un pronóstico negativo ya que, a pesar de hacer una cirugía para corregir la craneosinostosis, ésta recidiva, provocando aumento de la presión intracraneal, y pérdida auditiva. La aparición *de novo* de la mutación c.749C>G está asociada a edad paterna avanzada (Rannan-Eliya, 2004).

Tabla 1.2. Características fenotípicas y genotípicas de las craneosinostosis sindrómicas.

	PFEIFFER	CROUZON	APERT	MUENKE	BEARE-STEVENSON	JACKSON-WEISS	CROUZON CON ACANTHOSIS	SINOSTOSIS CORONAL AISLADA	SAETHRE-CHOTZEN	CRANEOFRONTONASAL	CARPENTER
<b>MIM</b>	101600	123500	101200	602849	123790	123150	612247	-	101400	304110	606144 y 604267
<b>Craneosinostosis</b>	bicoronal con o sin sagital	bicoronal y múltiple	bicoronal y múltiple	unicoronal > bicoronal	bicoronal y múltiple	bicoronal y múltiple	bicoronal y múltiple	uni o bicoronal	coronal (bi>uni) múltiples	coronal	coronal, sagital, lambdaidea
<b>Manos</b>	dedo gordo	normal	sindactilia	normal	normal	normal	normal	normal	Puede haber braquidactilia y sindactilia de 2/3	polidactilia	sindactilia, polidactilia postaxial
<b>Pies</b>	dedo gordo	normal	sindactilia	dedo gordo	normal	dedo gordo	normal	normal	Puede haber braquidactilia y sindactilia de 2/3	polidactilia	sindactilia, polidactilia postaxial
<b>Otros</b>	hipertelorismo, estrabismo, estenosis o atresia coanal, laringo-, traqueo-, broncomalacia, sinostosis del radio y húmero, puede asociar retraso mental, malformación Arnold-Chiari. Existen distintos subtipos con distinta gravedad	hipertelorismo con proptosis, estrabismo, hipoplasia maxilar, prognatismo mandibular, atresia de los conductos externos auditivos, puede asociar retraso mental	hipoplasia media facial, pérdida auditiva, hipertelorismo, malaoclusión y retraso en erupción, defecto de septo ventricular, retraso mental variable, agenesia del cuerpo calloso, hidrocefalia, ventriculomegalia, ausencia del <i>septum pellucidum</i>	pérdida auditiva hasta un 95% de los casos. Retraso en el desarrollo e inteligencia límite en el 30%.	<i>cutis gyrate</i> con <i>acanthosis nigricans</i> , cráneo en trébol, orejas de implantación baja y rotadas, agenesia cuerpo calloso, retraso en el desarrollo.	hipertelorismo, proptosis, hipoplasia del tercio medio facial	<i>acanthosis nigricans</i> y tumores odontogénicos	-	orejas dismórficas, deformidad nasal, talla baja, pueden asociar retraso mental y cáncer de mama y otros carcinomas	alteraciones oculares, hipoplasia unilateral de pecho, hiperlaxitud, hipotonía, retraso madurativo pero con CI normal, hipoplasia o agenesia del cuerpo calloso	obesidad, alteraciones cardíacas, baja estatura, pérdida auditiva, onfalocelo, ausencia de coxis, escoliosis, CI variable
<b>Gen</b>	<i>FGFR2</i> y <i>FGRF1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FGFR2</i> >98%: p.Pro252Trp y p.Ser253Arg	<i>FGFR3</i> : p.Pro250Arg	<i>FGFR2</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FGFR3</i> : p.Ala391Glu	<i>FGFR2</i>	<i>TWIST</i>	<i>EFNB1</i>	Tipo 1: <i>RAB23</i> Tipo 2: <i>MEGF8</i>
<b>Localización cromosómica</b>	10q26.13 y 8p11.23-p11.22	10q26.13	10q26.13	4p16.3	10q26.13	10q26.13	4p16.3	10q26.13	7p21.1	Xq13.1	Tipo 1: 6p11.2 Tipo 2: 19q13.2
<b>Herencia</b>	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	Ligada al X dominante más severa en mujeres heterocigotas y hombres en mosaico que en hombres con mutación pura	AR
<b>Variabilidad clínica</b>	se describen 3 subtipos en función de la severidad y clínica	-	no	muy alta	no	-	-	-	muy alta		-
<b>Edad paterna avanzada</b>	sí	sí	sí	sí	sí	desc	sí	desc	desc	desc	desc

### 1.2.1.2. Gen *FGFR2*. Patologías asociadas: síndrome de Apert y síndrome de Crouzon

El **síndrome de Apert** (MIM101200), también denominado acrocefalosindactilia tipo I, se caracteriza por una craneosinostosis de varias suturas, principalmente la coronal, que da lugar a una braquicefalia o acrocefalia. Los pacientes con este síndrome presentan hipoplasia media facial con hipertelorismo, proptosis y estrabismo por el acortamiento del hueso orbital. Es característica la sindactilia de manos y pies que suele implicar a las estructuras óseas adyacentes con la fusión de todos los dedos (mano en cucharón) a un mínimo de tres dedos centrales. También pueden presentar fusión de radio y húmero y de las vértebras C2-C3, y malformaciones viscerales, particularmente del sistema nervioso central con la presencia de ventriculomegalia y retraso mental (Slaney, 1996).

La prevalencia está estimada en 1 por cada 60.000 recién nacidos vivos y representa el 4,5% de las craneosinostosis (Boletín del ECEMC, serie V, nº6, 2007).

En el 98% de los casos es debido a la presencia de una de las dos siguientes mutaciones en heterocigosis en el gen *FGFR2*: c.934C>G; p.Ser252Trp o la c.937C>G; p.Pro252Arg (Wilkie, 1995). La primera mutación es más frecuente (66% de los casos) y presenta anomalías craneofaciales más severas. La segunda es menos frecuente y asocia sindactilia más severa. El 98% de los casos son esporádicos y se asocian a la edad paterna avanzada (Moloney, 1996; Martin, 2014).

El **síndrome de Crouzon** (MIM123500) es una de las formas más leves de presentación de las craneosinostosis sindrómicas, junto con el síndrome de Muenke. Presenta afectación exclusiva del cráneo y no hay afectación de miembros. La variabilidad fenotípica es muy alta con pacientes que desarrollan una craneosinostosis severa que afecta a su vida cotidiana y otros que no requieren ningún tipo de intervención y desarrollan una vida absolutamente normal (Helman, 2014). Las características principales son la craneosinostosis normalmente bicoronal, aunque puede ser múltiple, con hipertelorismo y proptosis ocular e hipoplasia media facial con prognatismo. Hasta un 26% sufren de hidrocefalia, presentando con frecuencia dolores de cabeza y convulsiones (Buchanan, 2014). La incidencia es de 1 caso cada 25.000 recién nacidos vivos (Gorlin, 1990). Es debido a mutaciones en el gen *FGFR2*, con una concentración de mutaciones en los exones 7 y 8 entre los aminoácidos 251 y 360.

Existe una variante en la que aparece de forma precoz y característica una lesión cutánea denominada *acanthosis nigricans* denominada **síndrome de Crouzon con *acanthosis nigricans*** (MIM612247) y es debido exclusivamente a la mutación p.Ala391Glu en el gen *FGFR3*.



Existen otras patologías asociadas a mutaciones en el gen *FGFR3* que pueden presentar o no alteraciones esqueléticas, como son el síndrome lacrimo-auriculo-dento-digital o síndrome de camptodactilia con talla alta y sordera (Makrythanasis, 2004), que al no ser objeto de esta tesis, no se comentan.

### 1.2.2. Gen *COMP*. Patologías asociadas: pseudoacondroplasia y displasia epifisaria múltiple

El gen *COMP* (19p13.11, MIM 60030) está constituido por 19 exones que codifican una proteína de 757 aminoácidos oligomérica extracelular ubicada en cartílago, ligamento y tendones. Esta proteína participa, entre otras funciones, en el ensamblaje del colágeno, interacciona con otras moléculas extracelulares, regula la proliferación de condrocitos y participa en la regulación de la apoptosis (Posey, 2014). Pertenece a la familia de las proteínas trombospondinas que unen calcio con alta afinidad. En la proteína se distinguen 4 dominios (Chen, 2008; Posey, 2014) (*figura 1.6*):

- La región N terminal, donde se unen las proteínas para formar un pentámero.
- 4 dominios de EGF-like, denominado T2.
- 7 dominios conservados calmodulina-like, denominados T3, de unión al calcio con alta afinidad.
- la región C terminal globular.

*Figura 1.6: Se muestran los 4 dominios de la proteína COMP: la región N terminal, los 4 dominios EGF-like (T2), los 7 dominios calmodulina-like (T3) y la región C terminal (Cheng, 2008)*



Las mutaciones en este gen dan lugar a dos displasias esqueléticas distintas: la pseudoacondroplasia y la displasia epifisaria múltiple.

Descrita en 1959 por Maroteaux y Lamy como la forma pseudo-acondroplásica de las displasias espondilo-epifisarias, la **pseudoacondroplasia** (MIM177170) presenta características que solapan con la ACH, como es la talla baja con acortamiento de miembros, pero no presenta la dismorfia facial característica de ésta. Existe deformidad de las piernas, con dedos cortos, articulaciones débiles, una marcada laxitud ligamentosa, rigidez articular y en la mayoría de los casos una osteoartritis temprana (Maroteaux, 1959). Se clasifica dentro de las espondilo-epifisarias por presentar radiológicamente epífisis pequeñas e irregulares con fracaso en la osificación de la epífisis anular de las vértebras dan-

do lugar a un característico efecto de pico en la radiografía lateral. La prevalencia está estimada en 1 en 30.000 recién nacidos vivos (<http://www.orphanet.net>).

La **displasia epifisaria múltiple** (MED) es una enfermedad en la que se da una falta de osificación de la epífisis, lo que provoca una deformidad ósea en las articulaciones y una artrosis temprana. Presenta una clínica y una base genética heterogéneas que queda patente en los 6 subtipos en los que se clasifica, de las cuales todas menos el tipo 4, presentan una herencia autosómica dominante donde, además, cada subtipo presenta un gen asociado (Briggs, 2002; **tabla 1.3**).

**Tabla 1.3. Tipología de displasias epifisarias múltiples**

DISPLASIA EPIFISARIA MÚLTIPLE		HERENCIA (AUTOSÓMICA)	GEN	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA
Tipo 1	MED1	Dominante	<i>COMP</i>	19p13.1
Tipo 2	MED2	Dominante	<i>COL9A2</i>	1p33-p32.2
Tipo 3	MED3	Dominante	<i>COL9A3</i>	20q13.3
Tipo 4	MED4/rMED	Recesiva	<i>SLC26A2</i>	5q32-q33.1
Tipo 5	MED5	Dominante	<i>MATN3</i>	2p24-p23
Tipo 6	MED6	Dominante	<i>COL9A1</i>	6q13

El fenotipo presentado es muy variado, incluso intrafamiliarmente, y existen manifestaciones clínicas tan leves que se cree que está infradiagnosticada. Como características principales y generales las MED presentan estatura baja, deformidad de las articulaciones con dolor, braquidactilia, alteraciones en la marcha y osteoartritis temprana. Radiológicamente, presentan epífisis irregulares en los huesos tubulares con cambios en el acetábulo (Anthony, 2015). Las formas dominantes suponen un 75% de todos los casos de MED diagnosticados molecularmente (Anthony, 2015). Entre un 10 y un 20% de los casos clínicos de MED no presentan mutaciones en estos seis genes con lo que se sospecha la existencia de otros genes aún no descritos (Anthony, 2015).

Está estimada una prevalencia de 0,5-1 cada 10.000 recién nacidos vivos (Unger, 2008).

En el gen *COMP*, el 80-95% de las mutaciones, tanto para la pseudoacondroplasia como para la MED, están descritas en los 7 dominios de repetición T3, que abarcan los exones del 8 (también denominado 13C como nomenclatura alternativa) al 14 (o 18A). Existe una mutación recurrente en el exón 13 y es la delección de 3 nucleótidos que codifica un ácido aspártico [c.1417\_1419del; p.Asp473del] de modo que la secuencia original de 4 ácidos aspárticos queda en 3. Según las series, esta mutación recurrente presenta una frecuencia del 22 al 36% de los pacientes afectados principalmente con un fenotipo pseudoacondroplásico, aunque hay algún caso descrito de MED (Hecht, 1995; Deere, 1998; Jackson, 2011). La siguiente región de concentración de mutaciones tras la an-

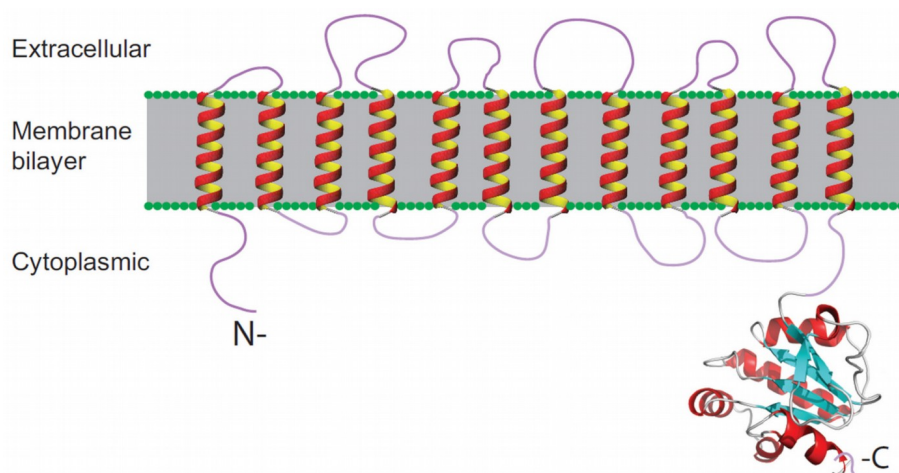
terior se encuentra entre los exones 16 al 18, de los 19 totales que presenta el gen (Briggs, 2002; Jackson, 2011).

Las mutaciones provocan que la proteína anómala sea retenida en el retículo endoplasmático rugoso que termina provocando los mecanismos apoptóticos de los condrocitos de la placa de crecimiento lo que provoca su disfunción (Posey, 2014). Esta teoría quedó comprobada con el estudio de ratones transgénicos nulos en *COMP*, los cuales no presentaban enanismo y eran relativamente normales. Por ello se considera que la enfermedad se produce por la acumulación de estas proteínas anómalas en el retículo endoplasmático rugoso (Posey, 2014).

### 1.2.3. Gen *SLC26A2*. Patologías asociadas: acondrogénesis tipo 1B, atelosteogénesis tipo 2, displasia diastrófica y displasia epifisaria múltiple tipo 4 o recesiva

El gen *SLC26A2* (5q32, MIM606718), también denominado *DTDST* (*diastrophic dysplasia sulfate transporter*), pertenece a la amplia familia de proteínas transportadoras de aniones SLC26, todas ellas formadas por 12 dominios transmembranas y las terminaciones N terminal y C terminal citoplasmáticas (Alper, 2013; **figura 1.7**). *SLC26A2* es una proteína transportadora de sulfatos que interviene en la sulfatación de los proteoglicanos en el cartílago a partir de una cisteína aportada por otra proteína extracelular que se utiliza como fuente de sulfatos. Las mutaciones en este gen disminuyen o inhiben la capacidad de utilizar esa cisteína por lo que no se produce o está disminuida la sulfatación de los proteoglicanos lo que provoca una desorganización de las fibras del colágeno, una mineralización temprana de los huesos y el fallo en el ensamblaje de la fibronectina de la matriz extracelular (Alper, 2013).

**Figura 1.7. Estructura de la proteína *SLC26A2* (Alper, 2013)**



Se han descrito más de 40 mutaciones en este gen que dan lugar a un amplio abanico de fenotipos, todos ellos con herencia autosómica recesiva: las formas

más graves y letales son la **acondrogénesis tipo 1B** (MIM600972) y la **telosteogénesis severa tipo 2** (MIM256050) y las dos formas no letales son la **displasia diastrófica** (MIM222600) y la **displasia epifisaria múltiple recesiva** (MED4 o rMED, MIM226900). En la **tabla 1.4** quedan descritas las características clínicas de estas entidades. La severidad de las mutaciones correlaciona con la actividad residual del transportador de sulfato, de modo que las mutaciones severas, con una mínima o ausente actividad, dan lugar a fenotipos más severos. La presencia de una actividad residual de la proteína da lugar a las formas no letales (Barbosa, 2010).

**Tabla 1.4. Fenotipos asociados a mutaciones en el gen SLC26A2**

Nombre	Mutaciones letales		Mutaciones no letales	
	<b>ACONDROGÉNESIS TIPO 1B</b>	<b>ATELOSTEOGÉNESIS TIPO 2</b>	<b>DISPLASIA DIASTRÓFICA</b>	<b>DISPLASIA EPIFISARIA MÚLTIPLE RECESIVA</b>
Nombre alternativo	(Displasia de Fraccaro)	(Displasia de la Chapelle)		rMED, EDM4
Herencia	Recesiva	Recesiva	Recesiva	Recesiva
MIM	600972	256050	222600	226900
Características fenotípicas	Micromelia extrema con dedos cortos	Rizomelia con dedo gordo en aducción	Micromelia con dedo gordo en aducción	Dolor articular, normalmente en rodillas y cadera
	Hipoplasia de tórax	Tórax estrecho	Deformidades columna vertebral: escoliosis, lordosis lumbar grave, cifosis cervical	Malformación de manos, pies y rodillas
	Abdomen protuberante	Abdomen protuberante	Contracturas de las articulaciones con deformidad y osteoartritis temprana	Escoliosis
	Cara plana con cuello corto	Dismorfia facial: fisura palatina, micrognatia, epicanto, puente nasal deprimido	Fisura palatina	Altura final entre 150-180cm
	Otros: Abundante tejido redundante: apariencia de feto hidrópico	Otros: Desviación de cúbito, separación entre el 1º y 2º dedos del pie, pies zambos, quistes en el oído externo	Otros: dislocación de radio, desviación de cúbito, separación entre el 1º y 2º dedos del pie, pies zambos	Otros: el 50% al nacimiento pueden presentar pies zambos, clinodactilia
Características radiológicas	Hipodisplasia grave de la columna vertebral, costillas y extremidades con cráneo normal	Desproporción de cuerpo frente a cráneo normal	Desproporción de cuerpo frente a cráneo normal	Epifisis planas con osteoartritis temprana
	Ausencia total o mínima de osificación de cuerpos vertebrales	Cuerpos vertebrales hipodisplásicos y cifosis cervical	Cifosis cervical con cuerpos vertebrales osificados de forma incompleta	Braquidactilia
	Costillas cortas y finas	Acetábulo plano con huesos ilíacos hipoplásicos. Hueso púbico sin osificar	Distancia interpedicular entre L1 a L5 acortada	Rótula en multicapa
	Acortamiento de huesos tubulares	Acortamiento de huesos largos con metafisis irregulares	Acetábulo plano con huesos ilíacos hipoplásicos. Hueso púbico sin osificar	
Pronóstico	Muerte: prenatal o tras nacimiento	Muerte al nacimiento o a los pocos días	No letal	No letal, puede pasar inavertida

Primero se describieron las tres primeras, considerando a la displasia diastrófica la forma no letal y leve dentro del abanico de presentación. Sin embargo, en 1999, Superti-Furga y col. describieron una nueva entidad clínica, que se diferenciaba de la displasia diastrófica al presentar una manifestación clínica más leve, a partir de un paciente que presentaba la mutación en homocigosis c.835C>T; p.Arg279Trp (Superti-Furga, 1999). Las 4 mutaciones más frecuentes en el espectro mutacional de los desórdenes del gen *SLC26A2* son p.Arg279Trp, c.-26+2T>C (mutación finlandesa fundadora), p.Arg178\* y p.Cys653Ser. Para la rMED constituyen el 90% de los alelos mutados, para la displasia diastrófica el 66% y para la acondrogénesis tipo 1B el 10% (Barbosa, 2010; GeneReviews Multiple Ephiphyseal Dysplasia, Recessive).

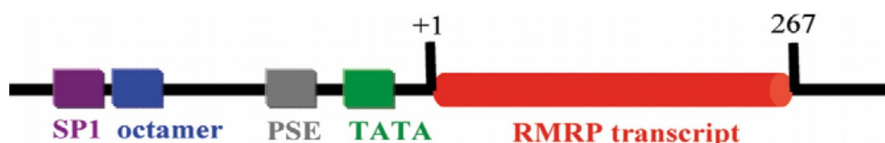
La severidad de las mutaciones viene definida por su tipo y localización, de modo que aquellas que truncan la proteína de forma temprana o se encuentran en los dominios transmembrana provocan las formas letales cuando se encuentran en homocigosis. Aquellas que provocan el cambio de un aminoácido por otro y no se encuentran en los dominios transmembrana, se manifiestan con expresiones más leves porque queda una actividad residual de la proteína (Barbosa, 2010).

La clínica presentada por los pacientes afectados de **displasia epifisaria múltiple recesiva o tipo 4** (MED4/rMED) suele ser de aparición más tardía que las formas dominantes de MED y sus características principales son talla normal-baja, deformidades de los dedos (incluida braquidactilia), pies equinovaros al nacimiento (1/3 de los casos), escoliosis moderada, dolor y limitación articular (Unger, 2008; Anthony, 2015). Radiológicamente presentan epífisis planas en los huesos largos, cambios en el acetábulo y rótula en multicapa capa (Büttner, 1925; Briggs, 2002). Esta característica clínica de la rótula se observa casi exclusivamente en los MED4 aunque ya se ha descrito en algún caso aislado de pacientes con MED2 y PSACH (Nakasima 2005; Vatanavicharn).

#### 1.2.4. Gen *RMRP*. Patologías asociadas: hipoplasia de pelo-cartílago, displasia anauxética y displasia metafisaria sin hipotricosis

El gen nuclear *RMRP* (9p13, MIM157660) está formado por 267pb en un único exón. Transcribe para una cadena de ARN que se une a un conjunto de más de 10 proteínas para formar una ribonucleasa con actividad enzimática (*mitochondrial RNA processing ribonuclease* o RNasa MRP). La expresión de esta ribonucleoproteína es ubicua en todos los tejidos, desarrollando su función en los núcleolos y en la mitocondria (Hermanns, 2005; Thiel, 2011). La estructura del gen *RMRP* es del tipo 3 de los promotores para la RNAPolIII y está formada por un elemento PSE (elementos proximales al promotor), la caja TATA, unas secuencias cortas que actúan como potenciadores de la transcripción (elementos distales al promotor o DSE, secuencias cortas de sitio de unión del factor SP1) y la secuencia octamérica (sitio de unión del factor Oct-1) (Welting, 2004; Hermanns, 2005) (**figura 1.8**).

**Figura 1.8.- Estructura básica del promotor tipo 3 (Hermanns, 2005)**



La función de este complejo RNasa MRP está bien caracterizada en levaduras, donde se ha visto que participan en la síntesis de ribosomas, en la formación de cebadores de ARN para la replicación del ADN mitocondrial y en la regulación

del ciclo celular al participar en la degradación del ARNm de ciclina B necesaria para iniciar la fase M de la mitosis (Thiel, 2011). Recientemente se ha descrito que el complejo RNasa MRP en humanos presenta:

1. Función ribosomal: participa en la maduración de la subunidad 5.8S de RNAr necesario para el ensamblaje del ribosoma.
2. Función ciclo celular: participa en la degradación de RNAm de Ciclina B2 necesario para la progresión del ciclo celular.

No se ha demostrado que participe en la duplicación del ADN mitocondrial en humanos como sí ocurre en la levadura pero sí que se ha descrito que la región 3' del gen *RMRP* juega un papel importante en la formación y actividad de las telomerasas humanas, aunque este papel está aún por caracterizar (Maida, 2009; Fujita, 2015).

Las mutaciones en el gen *RMRP* dan lugar a distintos fenotipos (heterogeneidad clínica):

La **hipoplasia de cartílago-pelo** (MIM250250), también conocida como condrodisplasia metafisaria tipo McKusick, fue descrita por primera vez en 1965 por el Dr. Víctor McKusick en la población amish de Norte América (McKusick, 1965). Hoy en día, el diagnóstico se establece por talla baja disarmónica, fémur y tibia incurvados, falanges cortas y engrosadas, laxitud de ligamentos con característica limitación a la extensión de los codos y pelo ralo (fino, escaso y decolorado). La talla final es, de media, de 131 cm en varones y 122cm en mujeres. Además pueden presentar déficit inmunitario, anemia moderada-severa, malabsorción intestinal o enfermedad de Hirschprung y predisposición a linfomas u otro tipo de cáncer. En esta población endogámica de amish, la frecuencia de portadores está estimada en 1 en 10 con una prevalencia de 1-2 en 1.000 recién nacidos vivos. Existe otro núcleo de alta prevalencia en Finlandia con una incidencia de 1 en 23.000 neonatos y una frecuencia de portadores de 1 en 76. Fuera de estas poblaciones no se conoce la incidencia de la enfermedad. En 1994 se describe el gen *RMRP* como causante de la enfermedad con un patrón de herencia autosómico recesivo (Sulisato, 1993; 1994a; 1994b).

En 2001 se describe otra entidad clínica denominada **displasia anauxética** (MIM 607095) caracterizada por una talla baja extrema desproporcionada debido a alteraciones metafisarias, epifisarias y de los cuerpos vertebrales con hipodontia y retraso mental moderado (Horn, 2001). En 2005 Thiel *et al*, asocian las mutaciones en el gen *RMRP* con esta patología (Thiel, 2005). De modo que, hoy en día sabemos que mutaciones en el gen *RMRP* dan lugar a distintas entidades clínicas que cursan desde una forma más leve donde sólo aparecen unas alteraciones metafisarias denominada **displasia metafisaria sin hipotricosis**, (MIM 250460) (Bonafe, 2002), pasando por una forma más acentuada donde existe esa displasia metafisaria pero también epifisaria (caso de la hipoplasia de pelo-

cartílago), hasta una forma muy grave que asocia graves alteraciones esqueléticas y retraso cognitivo en la displasia anauxética. En la última revisión realizada se pone de manifiesto la presencia de pacientes con mutaciones en *RMRP* e inmunodeficiencias severas sin las alteraciones radiológicas típicas de la hipoplasia de cartílago-pelo (Ip, 2015).

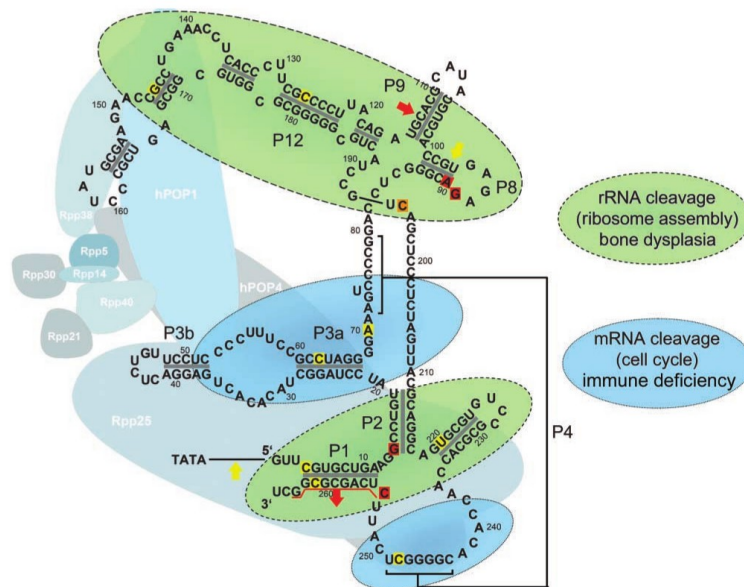
Se han descrito varias mutaciones causantes de los distintos fenotipos. Aparte de la mutación fundadora g.70A>G descrita en las poblaciones amish y finlandesa (Rindapää, 2002), a fecha de hoy, hay más de 100 mutaciones descritas. Estas mutaciones se pueden dividir en dos tipos (**Figura 1.9**):

1. Aquellas mutaciones en la secuencia del gen *RMRP* que modifican su estructura tridimensional. Estas mutaciones se encuentran en regiones conservadas evolutivamente o que afectan a su estructura e impiden un buen ensamblaje en el complejo RNasa MRP, afectando a la función ribosomal o a la del ciclo celular.
2. Aquellas que aumentan la distancia entre la caja TATA y el punto de inicio de la transcripción, que da lugar a un transcrito normal pero con niveles reducidos. Incluso puede ocurrir la nula transcripción.

El estudio de mutaciones *in vitro* en diferentes posiciones para verificar las funciones de este complejo confirman que aquellas que afectan a la función ribosomal de forma grave o que una de las mutaciones dé lugar a un transcrito nulo, correlacionan con fenotipos con mayor grado de displasia esquelética. Aquellas que afectan a la función del ciclo celular o ribosomal de forma moderada o que una de las mutaciones dé lugar a un transcrito disminuido, sólo se ven en las formas menos graves, es decir, en la hipoplasia cartílago-pelo y en displasia metafisaria sin hipotricosis. Las mutaciones que afectan al ciclo celular están asociados a la susceptibilidad al cáncer, a la disfunción de la médula ósea (inmunodeficiencia y anemia) y a la displasia del pelo (Thiel, 2007; 2011). Hasta la fecha no se han descrito pacientes que presenten 2 mutaciones que den lugar a un transcrito nulo por lo que se consideran que deben ser mutaciones letales.



Figura 1.9. Complejo RNasa MRP con el dominio en color verde donde se encuentra la función ribosomal y el dominio en azul de la función en el ciclo celular (Thiel, 2007)



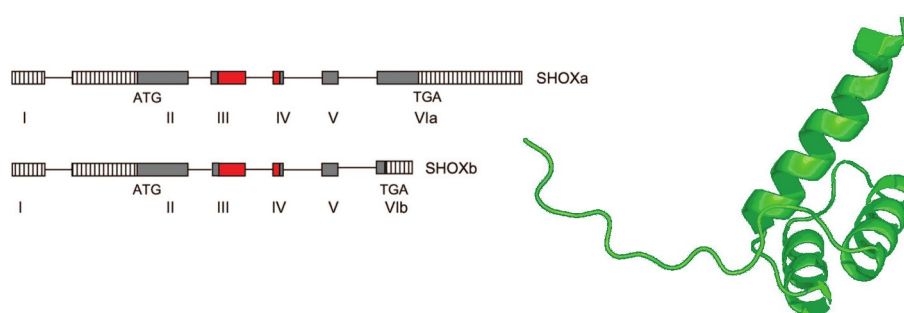
### 1.2.5. Gen *SHOX*. Patologías asociadas: discondrosteosis de Léri-Weill, displasia mesomélica tipo Langer y talla baja idiopática

El gen *SHOX* (*short stature homeobox-containing gene*, MIM312865) se localiza en la región pseudoautosómica (PAR1) del brazo corto del cromosoma X o el cromosoma Y (Xp22/Yp11.3). Descrito por Ellison en 1996 con el nombre de *PHOG* (*Pseudoautosomal homeobox-containing osteogenic gene*; Ellison, 1996), pertenece a una familia de reguladores transcripcionales caracterizados por presentar en su secuencia la codificación para 60 aminoácidos de unión al ADN en forma de 3 hélices alfa, denominado homeodominio (Marchini, 2004). Está constituido por 7 exones a lo largo de 40 kb y presenta 2 transcritos que se diferencian en su secuencia 3'UTR: *SHOXa*, con 292 aminoácidos, y *SHOXb*, con 225 (Marchini, 2007) (**figura 1.10**). Ambos se expresan mayoritariamente en los fibroblastos de médula pero *SHOXa* además se expresa en otros tejidos como el músculo esquelético, placenta, páncreas y corazón; mientras que *SHOXb* presenta un patrón de expresión mucho más reducido (riñón fetal y músculo esquelético) y en el periodo embrionario (Rao, 1997; Marchini, 2007). Sin embargo, sólo *SHOXa* actúa como activador transcripcional sobre las células osteogénicas que se transformarán en osteoblastos, de modo que, en general, en el hueso, *SHOXa* se expresa principalmente en la porción media de las extremidades y asegura un correcto balance entre la proliferación y apoptosis durante la embriogénesis y el crecimiento del mismo (Marchini, 2004; Gatta, 2014).



El gen *SHOX*, al estar localizado en la región PAR1, escapa a la inactivación del cromosoma X por lo que es necesaria la presencia de dos alelos silvestres para presentar un fenotipo normal. La ausencia de un alelo provoca una baja concentración de proteína *SHOX* funcional (haploinsuficiencia) que se traduce en una proliferación atípica de los condrocitos y a defectos en la diferenciación provocando un crecimiento longitudinal retardado en los huesos (Marchini 2004; Munns, 2004). La haploinsuficiencia del gen *SHOX* representa la causa principal del fracaso del crecimiento en las niñas afectas de síndrome de Turner las cuales presentan un cariotipo 45,X (Ross, 2001).

**Figura 1.10.** A la izquierda se representan las dos isoformas del gen *SHOX*. Constituido por 6 exones, sólo codifican 5: del II al VI. Las isoformas se diferencian entre sí en el exón 6. En rojo se indica el homeodominio. Con barras se indica las regiones no codificantes. A la derecha se muestra el modelo in silico en 3 dimensiones (Marchini, 2007).



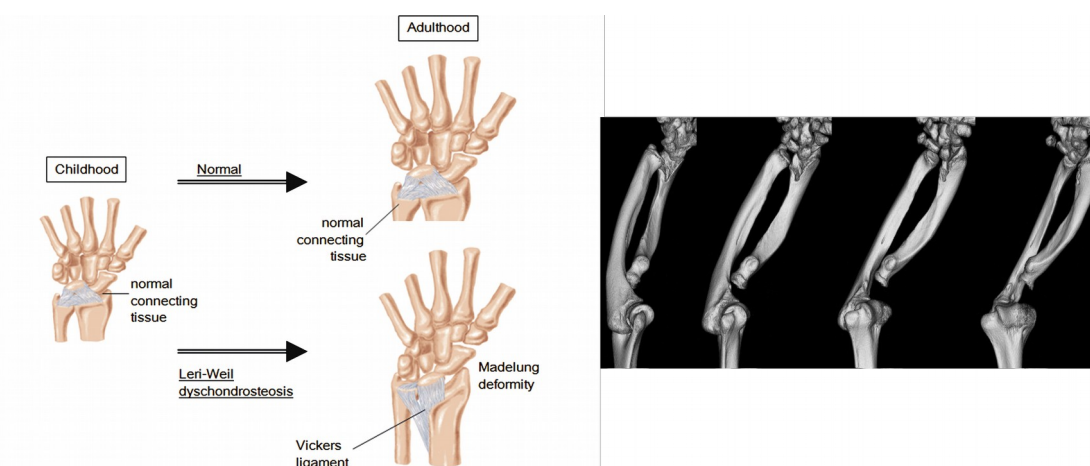
Existen numerosas mutaciones descritas que van desde grandes deleciones o duplicaciones a mutaciones puntuales tanto en el propio gen (más de 380 mutaciones descritas) como en la región 5' y la extensa región 3' en donde se han ubicado las regiones reguladoras del gen (Belin, 1998; Shears, 1998; Grigelioniene, 2001; Benito-Sanz 2005; Benito-Sanz, 2012). La penetrancia de la haploinsuficiencia de la proteína *SHOX* se considera alta pero su expresión es muy variable lo que provoca que la relación genotipo-fenotipo sea débil y hace el consejo genético más difícil de abordar (Nicolosi, 2010).

La persona portadora de una mutación en el gen *SHOX* tiene un 50% de posibilidades de transmitirlo a su descendencia. Esto ocurre así cuando es la mujer quien porta la alteración: su descendencia, sea varón o hembra, portará la mutación con un 50% de posibilidad. Sin embargo, la transmisión cuando es el varón quien lleva la alteración es distinta ya que tiene una característica peculiar: la capacidad de "saltar" de un cromosoma sexual a otro; es decir, un varón que presenta la deleción en el cromosoma Y tiene un 60% de probabilidad de transmitirlo a su descendencia masculina (y por tanto, la alteración continúa en el cromosoma Y) pero también tiene un 40% de transmitirlo a su descendencia femenina (y por tanto, el gen "salta" al cromosoma X paterno que lo transmite así a su descendencia femenina) (Evers, 2011; Kant, 2011). Este tipo de herencia se ha denominado herencia pseudoautosómica.

Las mutaciones de este gen dan lugar a tres fenotipos distintos: la discondrosteosis de Léri-Weill, la displasia mesomélica de tipo Langer y la talla baja idiopática.

La **discondrosteosis de Léri-Weill** suele presentarse como una talla baja disarmónica y mesomélica con alteraciones en el antebrazo: acortamiento y arqueamiento del radio, con prominencia de la cabeza del cúbito que provoca la dislocación dorsal del cúbito distal y una movilidad limitada de la muñeca, alteración que se denominada deformidad de Madelung (Madelung, 1878; Léri, 1929) (**figura 1.11**).

**Figura 1.11. Deformidad de Madelung: representación esquemática y perspectiva tridimensional (Seki, 2014)**



Descrita por el Dr. Langer en 1967, la **displasia mesomélica de tipo Langer** (Langer, 1967) se caracteriza por talla baja con mesomelia severa en extremidades, hipoplasia de cúbito y peroné e hipoplasia mandibular en grado variable. La inteligencia suele ser normal (Pérez Rodríguez, 2007).

Las mutaciones en heterocigosis del gen *SHOX* explican el 67-70% de los casos descritos para la discondrosteosis de Léri-Weill (Binder, 2004; Gatta 2007; Stuppia, 2010). Las mutaciones se ven afectadas por el género y la edad del paciente, de modo que las mujeres presentan un fenotipo más agresivo que los varones. Esto se hace más evidente a partir de la adolescencia con una talla normalmente patológica (Ross, 2001; Rapold, 2002a)). También se presenta variabilidad fenotípica dentro de la misma familia y así para una misma alteración puede haber familiares con claros signos característicos de este síndrome y otros que sólo presenten ligera disarmonía con talla normal (Kant, 2011).

Las mutaciones en homocigosis o doble heterocigosis del gen *SHOX*, que provocan una casi nula proteína SHOX funcional se encuentran en el 75% de los pacientes afectados de displasia mesomélica de Langer (Zinn, 2002).

La primera publicación que relacionaba el gen *SHOX* con la **talla baja idiopática** data de 1997, por Rao y col., que además describía este gen y sus dos isoformas. En función del método de diagnóstico y de la selección de los pacientes, el porcentaje en las mutaciones del gen *SHOX* que provoca un fenotipo de talla baja idiopática varía. Hoy en día se da una cifra comprendida entre 2-15% (Chen, 2009; Albuissou, 2012).

Considerando una frecuencia de defectos en el gen *SHOX* de un 3% entre los individuos con TBI, la prevalencia sería de 1 en 1.000 recién nacidos vivos (Nicolosi, 2010). Esta prevalencia es mayor que las deficiencias en el eje de la hormona de crecimiento (1 en 3.500 recién nacidos vivos) y que la del síndrome de Turner (1 en 2500 mujeres vivas) sugiriendo que la deficiencia en el gen *SHOX* podría ser una de las alteraciones monogénicas más frecuentes que causan la talla baja (Nicolosi, 2010)

### 1.3. EL ASESORAMIENTO O CONSEJO GENÉTICO

El asesoramiento o consejo genético es el proceso de comunicación entre el facultativo o personal sanitario específicamente formado para ello, y el individuo afecto o susceptible de padecer una enfermedad genética. En este proceso de comunicación se habla de la enfermedad explicando sus características clínicas, las posibles opciones de tratamiento y, sobre todo, las características genéticas que presentan. Dentro del campo de la genética se explica el patrón de herencia, las posibles peculiaridades genéticas que pueda presentar (anticipación genética, distinción entre sexos, penetrancia...), se identifica a posibles portadores/afectos entre la familia y se abordan las opciones reproductivas existentes para conseguir una descendencia libre de la enfermedad.

El consejo genético queda definido mediante una ley y una orden: la Ley 14/2007 de Investigación biomédica de 2007, donde se define, y en la Orden SSI/2065/2014 donde queda establecida dentro de la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud. En esta última Orden se incluye un nuevo apartado para la atención a los pacientes y familiares en el área de la Genética, se especifica la necesidad de personal cualificado para su realización, los grupos de patologías para los que se indicará, se vinculan los análisis genéticos al consejo genético y se definen los criterios de inclusión y exclusión para la reproducción asistida como método reproductivo ante enfermedad genética, ya que se reconoce esta técnica con fines preventivos para la no transmisión de la enfermedad a la descendencia.

Todo el procedimiento parte de una primera consulta en la que se recogen los datos familiares, se realiza el árbol genealógico y la anamnesis. Si el trastorno padecido tiene gen reconocido se informa del tipo de test con las limitaciones del mismo y las implicaciones personales y familiares que del test se derivan. Con toda la información recibida, se solicita una muestra para la realización

de la prueba tras firma del consentimiento informado que debe ser fiel reflejo de lo dicho verbalmente.

Tras la realización de las pruebas pertinentes, el paciente vuelve a acudir a la consulta para recibir la información. En general nos podemos encontrar ante dos situaciones, ambas con la necesidad de un consejo genético: a) no se obtiene un resultado genético que confirme el diagnóstico, con lo cual hablamos de riesgos empíricos, si es una enfermedad o síndrome conocido, o queda a expensas de nuevos datos que permitan un nuevo diagnóstico; b) se obtiene un resultado genético confirmatorio con lo cual se identifica la alteración familiar que produce la enfermedad y se puede realizar un consejo genético concreto y extender el estudio a los familiares.

El consejo genético reproductivo es uno de los pilares dentro del consejo genético general y uno de los motivos principales de solicitud en la consulta de Genética Clínica. En general se solicitan las opciones para tener una descendencia libre de la enfermedad. Para ello es condición *sine qua non* conocer la mutación familiar. Las opciones reproductivas existentes hoy en día, algunas de ellas en proceso de validación, son las siguientes:

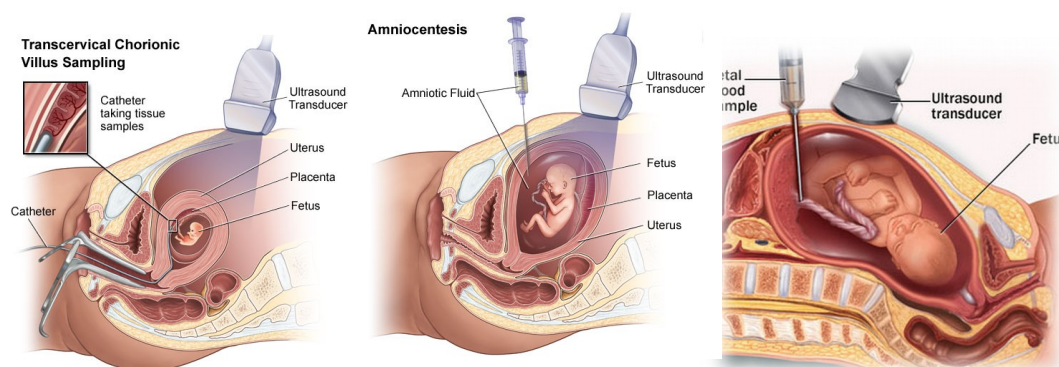
1. Diagnóstico genético no invasivo: es el estudio de ADN fetal en sangre materna. No conlleva riesgo de pérdida fetal ya que es una extracción de sangre periférica. Puede ser mediante el estudio de células circulantes fetales o de fragmentos de ADN fetal libre en el torrente sanguíneo (el de mayor sensibilidad y el más utilizado). Para poder distinguir el material fetal del materno se amplifica información genética que sólo puede ser fetal: gen *SRY* (condición de varón), mutaciones de origen paterno (por enfermedad dominante paterna o por enfermedad recesiva con una mutación distinta a la presentada por la madre), estudio de marcadores polimórficos paternos. El objetivo es evitar el diagnóstico prenatal en un porcentaje de los casos.
2. Diagnóstico genético invasivo
  - 2.1. Diagnóstico genético prenatal: consiste en el análisis genético del material fetal cuando hay un embarazo en curso. Se obtiene la muestra mediante técnicas invasivas obstétricas que conllevan un riesgo de pérdida fetal. Existen tres métodos aunque los dos primeros son los más frecuentemente utilizados:
    - 2.1.1. Biopsia de corion: se realiza a partir de la semana 11 de gestación y puede ser transcervical o transabdominal. Presenta un riesgo de pérdida fetal estimado en 1,79% (Akolekar, 2015) (**figura 1.12**). Tiene la ventaja de que la cantidad de muestra fetal obtenida es alta y que tras el resultado, y si éste es adverso, la interrupción legal del embarazo se realiza en el primer trimestre. En

un porcentaje pequeño de los casos la vellosidad puede dar lugar a resultados de difícil interpretación como son los mosaicismos confinados a la placenta o la contaminación materna.

2.1.2. Amniocentesis: para la obtención de amniocitos del líquido amniótico. Se realiza a partir de la semana 15 de gestación y tiene un riesgo de pérdida fetal estimado en 0,61% (Akolekar, 2015) (**figura 1.12**). Las ventajas frente a la biopsia es que es de más fácil acceso la obtención de la muestra. Ante un resultado adverso y la solicitud de interrupción legal, ésta se realiza en el segundo trimestre del embarazo.

2.1.3. Cordocentesis: es la obtención de sangre fetal por punción en el cordón umbilical. El riesgo de pérdida fetal es alto y además la punción es difícil de realizar por lo que es una técnica menos utilizada (**figura 1.12**). Se realiza a partir de la semana 20 de gestación, cuando se ha formado el cordón umbilical.

**Figura 1.12: Esquema de una biopsia de vellosidad corial transcervical (izquierda), de una amniocentesis (centro) y de una cordocentesis (derecha). Las dos primeras imágenes tomadas de <http://www.hopkinsmedicine.org> . La tercera tomada de la Mayo Foundation for Medical Education and Research**



2.2. Técnicas de reproducción asistida: consiste en la manipulación y fecundación de los gametos sexuales en el laboratorio y su implantación en el útero materno. Estas parejas utilizan estas técnicas no porque presenten problemas de fertilidad, sino porque no quieren transmitir la enfermedad a la descendencia. Se puede realizar:

2.2.1. Mediante donación de gametos sexuales: consiste en la obtención de embriones por sustitución de los gametos del progenitor afecto por otros de un donante.

2.2.2. Con gametos propios: consiste en realizar el estudio genético de los embriones por biopsia del blastómero (3<sup>er</sup>-5<sup>o</sup> día tras la

fecundación) para la selección de aquellos libres de la enfermedad. La técnica de reproducción asistida utilizada es la FIV+ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides), que consiste en la introducción manual de un espermatozoide completo en un ovocito en el laboratorio con el fin de evitar cualquier posible contaminación de otros gametos. Es imprescindible conocer la mutación familiar previa a la realización de la técnica y es necesario un estudio de haplotipos familiar para conocer la informatividad de los marcadores utilizados.

El diagnóstico genético invasivo está contemplado dentro de la cartera de servicios básicos del Sistema Nacional del Salud.

### 3. Adopción

### 4. Asunción de un hijo afecto

En el asesoramiento hay que tener en cuenta también la presencia de los mosaicismos gonadales, es decir, la presencia en las gónadas sexuales de más de una línea celular, una de ellas con la alteración, por lo que el riesgo es mayor. Esta situación se da cuando se detecta una mutación en un paciente y no se detecta en la sangre periférica de los progenitores. El riesgo de recurrencia es bajo pero no nulo ya que puede haber mosaicismo germinal. Este riesgo es variable entre las distintas enfermedades y es empírico, es decir, de la observación en la práctica.

La práctica diaria de la Genética clínica está ligada a la aplicación de los principios bioéticos (Autonomía, Justicia, No Maleficencia y Beneficiencia) y en ellos hemos de basarnos para dar una asistencia de calidad y resolver los problemas morales que del manejo de los pacientes se puedan derivar. El principio de autonomía está basado en el derecho a conocer o no un resultado genético, ya establecido en la Declaración sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos ([http://www.genomicslawreport.com/wp-content/uploads/2011/02/Health\\_Matrix\\_-\\_Journal\\_of\\_Law-Medicine\\_Vol\\_20\\_2010.pdf](http://www.genomicslawreport.com/wp-content/uploads/2011/02/Health_Matrix_-_Journal_of_Law-Medicine_Vol_20_2010.pdf)). Su máxima expresión se recoge en el consentimiento informado, tanto de aceptación como de denegación de la realización del test, que el paciente firma.

## **2. objetivos**





# Objetivos

## Objetivo general

El objetivo general de este trabajo fue la caracterización genético-clínica prenatal y postnatal de pacientes que presentaban displasias esqueléticas a partir de muestras recogidas durante el periodo 1998-2012 mediante la aplicación de técnicas moleculares así como el diseño de protocolos de actuación para ofrecer a los pacientes y sus familiares el adecuado asesoramiento genético.

## Objetivos específicos

1. Caracterización genético-clínica en muestras prenatales (restos abortivos y fetos) con alteraciones ecográficas sugerentes de displasia ósea.
2. Establecimiento de algoritmos de actuación y asesoramiento genético de fetos con y sin confirmación diagnóstica.
3. Caracterización genético-clínica en muestras postnatales:
  - 3.1. Pacientes con talla baja armónica y disarmónica
  - 3.2. Pacientes con craneosinostosis
  - 3.3. Pacientes con síndromes clínicamente reconocibles de baja prevalencia
4. Valoración de la escala de Rappold como herramienta de cribado en la selección de pacientes candidatos a estudio de gen *SHOX*
5. Asesoramiento genético individual, familiar y reproductivo en pacientes con displasias esqueléticas.



### **3. pacientes y métodos**



## 3. PACIENTES Y MÉTODOS

En el año 2007 se prepara y se concede por la Fundación Ramón Areces el proyecto “Estudio de las bases moleculares de las malformaciones congénitas: cardiovasculares, oculofaciales y esqueléticas”; con la Dra. María José Trujillo Tiebas como investigador principal y por una duración de 3 años. De este proyecto se realizan dos tesis doctorales: la primera de ellas realizada por la Dra. Mónica Martínez García, bajo el título *Caracterización genético-clínica, algoritmos de actuación y consejo genético en pacientes con defectos congénitos de baja prevalencia (cardíacos, craneofaciales, esqueléticos y/u oculares)*, defendida en la Universidad Autónoma de Madrid, en 2013. La segunda tesis doctoral es la realizada por esta autora.

La recogida de muestras se realizó en dos periodos:

- Desde 1998 a finales de 2006: se recogen todos los datos clínicos y estudios genéticos de las muestras procesadas, principalmente basadas en el estudio del gen *FGFR3*.
- De 2007 a 2012: donde se amplía el grupo de estudio del gen *FGFR3* y se desarrollan estrategias para dar respuesta a la demanda de diagnóstico de otras patologías óseas.

### 3.1 PACIENTES ESTUDIADOS

Los casos procedían de distintos centros hospitalarios:

- Los servicios de Ginecología y Obstetricia, Genética y Pediatría de la Fundación Jiménez Díaz (FJD).
- De los servicios de Obstetricia y de Pediatría del Hospital Universitario Clínico San Carlos (HCSC)
- Del servicio de Pediatría del Hospital Infanta Elena.
- De otros servicios de hospitales o centros privados tanto de Madrid como de otras comunidades.

Los pacientes y/o progenitores o tutores legales englobados en esta tesis fueron informados y dieron su consentimiento para la obtención de las muestras y la realización de los estudios necesarios, plasmado en la firma del consentimiento informado, de acuerdo con la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica (<http://www.boe.es/boe/dias/2007/07/04/>). Previo a 2007 se recogieron los datos de las pruebas que los pacientes habían accedido a realizarse. Las muestras empleadas en este estudio procedieron del Biobanco RD/009/0076/00101 de la FJD.

Se excluyeron del estudio 70 casos por ausencia de información o por presentar patologías de base no ósea.

### **3.1.1. Restos abortivos**

Se recogieron un total de 30 restos abortivos repartidos en 19 casos en el periodo 1998-2006 y 11 casos entre 2007-2012. Un caso del segundo periodo fue excluido por ausencia de información y una solicitud final de displasia no ósea.

Para realizar el estudio se parte de los datos de 29 restos abortivos enviados al Servicio de Genética de la FJD durante el período 1998-2012, con indicación clínica de displasia ósea. Estas muestras provenían tanto del Servicio de Ginecología y Obstetricia de la FJD, como de distintos hospitales de todo el Estado o de Clínicas Privadas con autorización para la interrupción legal del embarazo.

Veintiocho muestras eran restos abortivos frescos y 1 era una muestra parafinada. La petición inicial fue para mutaciones en *FGFR3* en 28 casos y sólo una de ellas venía para estudio de *FGFR2*. Ante la solicitud de confirmación molecular de síndrome de Apert diagnosticado por la necropsia realizada al aborto ACH-71, con fines reproductivos, se decidió poner a punto este gen en el laboratorio.

A partir de 2005, y en aquellos casos en los que se enviaba el feto completo, se tomaban muestras fotográficas y radiológicas, para posibles diagnósticos diferenciales posteriores.

En la **tabla 3.1** se especifican las muestras estudiadas, con las edades de gestación, la indicación clínica, la edad de los progenitores y los datos aportados en el informe de solicitud.

Tabla 3.1: Características de las muestras de restos abortivos estudiadas

FAMILIA	PROCEDENCIA/ AÑO	TIPO DE MUESTRA	SEMANAS GESTACIÓN	INDICACIÓN CLÍNICA	GEN SOLICITADO	EDAD PADRE	EDAD MADRE	CLÍNICA
ACH 4	FJD/1999	resto abortivo	16	Displasia ósea	FGFR3	43	29	Sin datos
ACH 11	FJD/2000	resto abortivo	17	Displasia ósea	FGFR3	35	34	Cinco abortos anteriores
ACH 12	Externo/2000	resto abortivo	20	Displasia ósea	FGFR3	DND	32	Sin datos
ACH 17	Externo/2000	resto abortivo	22	Displasia ósea	FGFR3	DND	22	Feto con enanismo
ACH 22	Externo/2001	resto abortivo	20	Displasia ósea	FGFR3	DND	28	Hipoplasia torácica, feto anterior igual patología
ACH 33	Externo/2001	resto abortivo	19	Displasia ósea	FGFR3	DND	31	Alteración en miembros
ACH 35	Externo/2001	resto abortivo	23	Displasia ósea	FGFR3	DND	27	Sin datos
ACH 37	Externo/2002	resto abortivo	12	Displasia ósea	FGFR3	DND	DND	Micromelia MMII
ACH 56	Externo/2003	resto abortivo	22	Displasia ósea	FGFR3	DND	27	Sin datos
ACH 57	Externo/2003	resto abortivo	23	Acondroplasia	FGFR3	45	29	Sin datos
ACH 58	Externo/2003	resto abortivo	21	Displasia ósea	FGFR3	DND	34	Sin datos
ACH 61	FJD/2003	resto abortivo	37	Displasia tanatofórica	FGFR3	DND	DND	CIR severo, cráneo en trébol, hipoplasia torácica, rizomelia
ACH 67	Externo/2003	resto abortivo	18	Displasia ósea	FGFR3	DND	32	Enanismo grave de características letales
ACH 69	Externo/2004	resto abortivo	20	Acondroplasia	FGFR3	DND	32	Micromelia, hidrocefalia
ACH 71	Externo/2004	resto abortivo	22	Apert	FGFR2	DND	38	Necropsia: sindactilia de manos y pies, compatible con Apert
ACH 82	Externo/2005	resto abortivo	23	Displasia ósea	FGFR3	DND	DND	Fémur corto y curvo, cráneo normal
ACH 85	Externo/2005	resto abortivo	21	Displasia ósea	FGFR3	33	33	Oligoamnios
ACH 86	Externo/2005	resto abortivo	22	Displasia ósea	FGFR3	DND	DND	Sin datos
ACH 93	Externo/2006	resto abortivo	22	Displasia ósea	FGFR3	39	30	Micromelia MMII, tibias curvas, mano en tridente, hidrocefalia
ACH 104	Externo/2007	resto abortivo	19	Displasia tanatofórica	FGFR3	42	32	Micromelia
ACH 107	Externo/2007	resto abortivo	21	Displasia ósea	FGFR3	33	25	CIR, hipoplasia torácica, agenesia cuerpo calloso, cardiopatía
ACH 111	Externo/2007	resto abortivo	19	Displasia ósea	FGFR3	33	26	Fémur curvo, costillas en V, CIR
ACH 121	Externo/2008	resto abortivo	22	Displasia ósea	FGFR3	35	34	Micromelia MMII, fémur y tibias curvos
ACH 122	FJD/2008	resto abortivo parafinado	>16	Displasia tanatofórica	FGFR3	34	33	Micromelia MMII con fémur recto, cráneo en trébol, tórax estrecho
ACH 161	Externo/2009	resto abortivo	22	Displasia ósea	FGFR3	DND	38	Micromelia MMII
ACH 207	Externo/2010	resto abortivo	21	Acondroplasia	FGFR3	DND	32	Disminución ángulo fronto-nasal con abombamiento frontal, tórax acortado y deprimido, micromelia con rizomelia y húmero y fémur curvos, polidactilia ambas manos con desviación cubital
ACH 243	Externo/2011	resto abortivo	22	Displasia ósea	FGFR3	DND	28	Micromelia
ACH 288	Externo/2012	resto abortivo	28	Displasia ósea	FGFR3	DND	DND	Micromelia, frente prominente, tórax normal, hipospadias
ACH 297	Externo/2012	resto abortivo	22	Acondroplasia, cardiopatía	FGFR3	DND	36	Sin datos

CIR: crecimiento intrauterino retardado. DND: dato no disponible. MMII: miembros inferiores

### 3.1.2. Estudios prenatales

Se recogieron un total de 80 muestras prenatales, repartidos en 29 casos en el periodo 1998-2006 y 51 casos entre 2007-2012. Se excluyeron 6 casos del presente trabajo, 1 del primer periodo y 5 del segundo, por ausencia de información o por presentar patologías de base no ósea.

Se estudiaron un total de 74 muestras prenatales de las cuales 69 casos procedían de la FJD y 5 casos procedentes del HCSC. Las muestras estudiadas procedían de distintos tejidos, siendo 28 de vellosidades coriales, 41 de amniocitos (líquido amniótico, LA) y 5 de ADN fetal en sangre materna.

El estudio solicitado por el facultativo responsable en las 74 muestras fue:

1. En 71 casos para estudio del gen *FGFR3*:
  - 25 casos sólo estudio de ACH,
  - 6 casos estudio de ACH+HCH,
  - 10 casos de displasia ósea tanatófora,
  - 2 casos de displasia ósea severa,
  - 18 casos de estudio general de displasia ósea sin especificar,
  - 1 caso solicitaba el estudio de la mutación p.Pro250Arg asociado al síndrome de Muenke,
  - 1 de craenosinostosis ligado a *FGFR3*,
  - y 8 casos variados: 3 CIR, 3 alteraciones de extremidades y 2 diagnósticos diferenciales (ACH/aneuploidía y ACH/Osteogénesis imperfecta).
2. En 3 casos para estudio familiar con mutación conocida:
  - 2 casos para el gen *RMRP*,
  - 1 caso para el gen *SHOX*.

Para el análisis de las muestras prenatales, se dividieron en tres categorías (**tabla 3.2**):

- 46 casos con afectación de un feto en una gestación en curso,
- 15 casos de gestaciones en las que existía un antecedente familiar con estudio molecular positivo.
- 13 casos de gestaciones en las que existía un antecedente familiar sin estudio molecular positivo.



**Tabla 3.2: Características de las muestras prenatales estudiadas. Con fondo rosa: alteración fetal en gestación en curso. Con fondo azul: antecedente con estudio molecular positivo. Con fondo verde: antecedente con estudio sin estudio molecular**

FAMILIA	PROCEDENCIA/ AÑO	TIPO DE MUESTRA	SEMANAS GESTACION	INDICACION CLINICA	GEN SOLICITADO	EDAD PADRE	EDAD MADRE	CLINICA
ACH 6	Externo/1999	biopsia corion	20	Displasia ósea	FGFR3	40	39	Micromelia
ACH 16	Externo/2001	biopsia corion	10	Acondroplasia	FGFR3	DND	DND	Madre acondroplásica (p.Gly380Arg)
ACH 23	FJD/2001	biopsia corion	9	Acondroplasia	FGFR3	37	35	Madre acondroplásica (p.Gly380Arg)
ACH 24	FJD/2001	biopsia corion	11	Acondroplasia	FGFR3	38	36	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
ACH 25	FJD/2001	biopsia corion	11	Acondroplasia	FGFR3	32	33	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
25	FJD/2002	biopsia corion	13	Acondroplasia	FGFR3	33	34	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
ACH 31	FJD/2002	líquido amniótico	20	Displasia ósea	FGFR3	35	34	Enanismo, hipoplasia torácica, cráneo en trébol
ACH 32	FJD/2002	biopsia corion	11	Displasia ósea	FGFR3	31	31	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO. Consanguinidad
32	FJD/2005	biopsia corion	11	Displasia ósea	FGFR3	35	35	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
ACH 46	FJD/2002	biopsia corion	15	Displasia ósea	FGFR3	38	34	Hijo acondroplásico (p.Gly380Arg) con otra pareja
ACH 48	FJD/2002	biopsia corion	19	Displasia ósea severa	FGFR3	35	32	Hidrops fetal masivo, micromelia, akinesia, sin cámara gástrica, derrame pleural bilateral, polidactilia
ACH 55	FJD/2003	biopsia corion	12	Acondroplasia	FGFR3	DND	34	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
ACH 63	Externo/2007	biopsia corion	11	Acondroplasia	FGFR3	DND	30	Madre acondroplásica (p.Gly380Arg)
ACH 65	Externo/2003	líquido amniótico	35	Displasia ósea	FGFR3	28	25	Sin datos clínicos
ACH 66	FJD/2003	biopsia corion	16	Displasia ósea severa	FGFR3	35	35	Micromelia severa
66	FJD/2008	líquido amniótico	17	Acondroplasia	FGFR3	40	40	Feto de embarazo anterior con micromelia por ECO
ACH 68	FJD/2003	biopsia corion	14	Displasia ósea	FGFR3	32	32	Sin datos clínicos. Consanguinidad
ACH 70	Externo/2004	líquido amniótico	17	Acondroplasia	FGFR3	39	29	Hija acondroplásica sin estudio molecular con otra pareja
ACH 75	Externo/2004	líquido amniótico	15	Muenke	FGFR3	35	38	Sobrina afectada de Sd Muenke (p.Pro250Arg)
ACH 83	Externo/2005	líquido amniótico	33	Acondroplasia	FGFR3	DND	26	Micromelia
ACH 87	Externo/2005	líquido amniótico	24	Displasia ósea	FGFR3	DND	42	Micromelia MMII con huesos curvos
ACH 89	Externo/2005	biopsia corion	11	Acondroplasia e hipocondroplasia	FGFR3	29	29	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
89	Externo/2008	líquido amniótico	15	Acondroplasia e hipocondroplasia	FGFR3	31	31	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
ACH 91	FJD/2006	biopsia corion	14	Acondroplasia	FGFR3	33	36	Madre acondroplásica (p.Gly380Arg)
ACH 92	Externo/2006	líquido amniótico	21	Acondroplasia e hipocondroplasia	FGFR3	33	36	Sin datos clínicos
ACH 96	Externo/2006	líquido amniótico	21	Acondroplasia	FGFR3	29	29	Rizomelia
ACH 97	Externo/2006	líquido amniótico	18	Displasia tanatofórica	FGFR3	48	38	Micromelia e hipoplasia torácica
ACH 98	FJD/2006	líquido amniótico	30	Acondroplasia e hipocondroplasia	FGFR3	39	39	Discrepancia ecográfica
ACH 100	FJD/2007	líquido amniótico	19	Acondroplasia e hipocondroplasia	FGFR3	33	35	CIR y fémur corto
104	FJD/2007	líquido amniótico	13	Displasia ósea	FGFR3	43	33	Feto de embarazo anterior con displasia ósea por ECO
ACH 105	FJD/2007	líquido amniótico	15	Displasia tanatofórica	FGFR3	41	36	Feto fémur curvo, hipoplasia torácica, cráneo normal
105	FJD/2008	biopsia corion	12	Displasia tanatofórica tipo I	FGFR3	41	36	Feto embarazo anterior afecto de displasia tanatofórica tipo I (p.Arg248Cys)
ACH 106	FJD/2007	líquido amniótico	26	Acondroplasia	FGFR3	37	32	Micromelia
ACH 113	FJD/2008	biopsia corion	14	Aneuploidias y acondroplasia	FGFR3	32	33	SN 3,5mm. Micromelia leve
ACH 114	Externo/2008	biopsia corion	12	Acondroplasia	FGFR3	41	39	Madre acondroplásica (p.Gly380Arg)
ACH 119	Externo/2008	biopsia corion	13	Acondroplasia e hipocondroplasia	FGFR3	27	28	Padre con acortamiento MMSS
ACH 120	Externo/2008	biopsia corion	12	Acondroplasia	FGFR3	38	40	Hijo acondroplásico (p.Gly380Arg)
ACH 122	FJD/2009	biopsia corion	11	Displasia tanatofórica tipo II	FGFR3	35	34	Feto embarazo anterior afecto de displasia tanatofórica tipo II (p.Lys650Glu)
ACH 123	FJD/2008	líquido amniótico	15	Acondroplasia	FGFR3	42	39	Hija acondroplásica,ao (p.Gly380Arg). FIV
ACH 125	FJD/2008	líquido amniótico	15	Displasias óseas	FGFR3	37	35	Feto de embarazo anterior con displasia tanatofórica por ECO

## Genes asociados a displasias esqueléticas

FAMILIA	PROCEDENCIA/ AÑO	TIPO DE MUESTRA	SEMANAS GESTACIÓN	INDICACIÓN CLÍNICA	GEN SOLICITADO	EDAD PADRE	EDAD MADRE	CLÍNICA
ACH 126	FJD/2008	líquido amniótico	22	Micromelia	FGFR3	37	34	Micromelia
ACH 127	Externo/2008	líquido amniótico	21	Displasia ósea	FGFR3	35	39	Hipoplasia torácica
ACH 128	Externo/2009	ADNfetal en sangre materna	9	Condrodisplasia metafisaria tipo McKusick	RMRP	40	34	Hijo afecto con estudio molecular positivo
128	Externo/2012	ADNfetal en sangre materna	9	Condrodisplasia metafisaria tipo McKusick	RMRP	43	37	Hijo afecto con estudio molecular positivo
ACH 129	Externo/2008	líquido amniótico	DND	Aneuploidías y acondroplasia	FGFR3	DND	DND	Fémur corto
ACH 130	Externo/2008	líquido amniótico	21	Displasia tanatofórica	FGFR3	36	31	Micromelia, hipoplasia torácica, CIR
ACH 137	FJD/2009	biopsia corion	13	CIR	FGFR3	34	36	Oligoamnios
ACH 152	FJD/2009	líquido amniótico	21	Delimitar translocación	SHOX	DND	32	Foco hiperecogénico cardíaco VI, Cribado combinado 1TM bajo riesgo
ACH 193	Externo/2010	líquido amniótico	30	CIR	FGFR3	DND	40	CIR
ACH 194	Externo/2010	líquido amniótico	15	Acondroplasia	FGFR3	35	20	SN 6mm, higroma quístico, polihidramnios, tórax estrecho, macrocefalia, micromelia leve
ACH 208	Externo/2010	biopsia corion	12	Displasia ósea	FGFR3	DND	41	SN 3,7mm. Micromelia
ACH 211	Externo/2010	líquido amniótico	21	Displasia ósea	FGFR3	33	35	Malformación MMSS, pie equino varo, pie en mecedora
ACH 221	FJD/2010	biopsia corion	29	Displasia ósea	FGFR3	37	36	Fémur corto, nariz chata, frente abombada
ACH 223	FJD/2010	ADNfetal en sangre materna	23	Acondroplasia	FGFR3	DND	35	Rizomelia leve, pie varo aducto
ACH 226	FJD/2011	biopsia corion	12	Displasia tanatofórica	FGFR3	30	34	Micromelia, tórax estrecho, puente nasal deprimido. Consanguinidad
ACH 230	FJD/2011	ADNfetal en sangre materna	35	Acondroplasia	FGFR3	DND	31	Gemelar biamniótico bicorial. Gemelo hembra presenta rizomelia
ACH 236	Externo/2011	líquido amniótico	21	Displasia ósea	FGFR3	DND	29	Micromelia MMII
ACH 244	FJD/2011	líquido amniótico	16	Acondroplasia	FGFR3	31	32	Sin datos clínicos
ACH 263	Externo/2011	líquido amniótico	29	Craneosinostosis	FGFR3	DND	37	Sin datos clínicos
ACH 265	Externo/2011	líquido amniótico	23	Displasia ósea	FGFR3	DND	21	Micromelia con fémur curvo, derecho fracturado, hendidura palatina, no labio leporino, cardiopatía, agenesia de cuerpo calloso, sin cámara gástrica
ACH 283	Externo/2012	líquido amniótico	20	Displasia tanatofórica	FGFR3	DND	35	Sin datos clínicos
ACH 288	Externo/2012	líquido amniótico	22	Acondroplasia/ Osteogénesis imperfecta	FGFR3	28	DND	Micromelia, frente prominente, tórax normal, hipospadias
ACH 308	FJD/2012	líquido amniótico	22	Acortamiento rizomélico	FGFR3	49	28	Sin datos clínicos
ACH 310	FJD/2012	líquido amniótico	30	CIR y micromelia	FGFR3	43	33	CIR
ACH 327	FJD/2012	líquido amniótico	18	Displasia tanatofórica	FGFR3	DND	DND	Semana 12 higroma. Semana 18 quistes en plexos coroides, focos hiperecogénicos en cardíaco VI, intestino y ambos riñones. Tórax estrecho, sin acortamiento de huesos largos. Oligoamnios absoluto.
ACH 328	Externo/2012	líquido amniótico	17	Displasia tanatofórica	FGFR3	35	30	Quistes bilaterales en plexos coroides, micromelia, fémures curvados sobre todo el izquierdo, cifoescoliosis, tórax estrecho, costillas cortas, malposición de pies, manos cortas sin poder descartar anomalías de dedos, ectasia plélica derecha de 6mm, polihidramnio leve
328	Externo/2013	biopsia corion	12	Displasia tanatofórica tipo I	FGFR3	36	31	Feto embarazo anterior afecto de displasia tanatofórica tipo I (p.Ser249Cys)
ACH 340	FJD/2012	líquido amniótico	21	Displasia ósea	FGFR3	DND	36	SN 7,4mm, higroma tabicado, ductus patológico, foco hiperecogénico cardíaco, CIR, micromelia
ACH 343	Externo/2012	líquido amniótico	33	Micromelia	FGFR3	DND	DND	Micromelia
HCSC 1	HCSC/2010	líquido amniótico	27	Acondroplasia	FGFR3	30	34	Rizomelia
1	HCSC/2010	ADNfetal en sangre materna	27	Acondroplasia	FGFR3	30	34	Rizomelia
1	HCSC/2012	biopsia corion	11	Acondroplasia	FGFR3	32	36	Feto embarazo anterior afecto de acondroplasia (p.Gly380Arg)
HCSC 2	HCSC/2011	líquido amniótico	19	Acondroplasia	FGFR3	DND	33	Gemelar bicorial biamniótico. Primer gemelo CIR y rizomelia
HCSC 3	HCSC/2012	líquido amniótico	17	Acondroplasia	FGFR3	31	32	Rizomelia

1TM: primer trimestre. CIR: crecimiento intrauterino retardado. DND: dato no disponible. ECO: ecografía. FIV: fecundación in vitro. MMII: miembros inferiores. MMSS: miembros superiores. SN: sonolusencia nucal. VI: ventrículo izquierdo

### 3.1.3. Estudio postnatales

Se recogieron un total de 281 casos, de los cuales 59 casos provenían del periodo 1998-2006 y 222 casos del periodo 2007-2012 entre los que se encuentran los 31 casos procedentes del HCSC. Se excluyeron 49 casos, 1 en el primer periodo y 48 del segundo, por ausencia de información o por presentar patologías de base no ósea.

El número total de casos postnatales analizados fue de 232. En función del gen principal estudiado, se pueden dividir:

#### 3.1.3.1. Gen *FGFR3*: Estudio de acondroplasia, hipocondroplasia, displasia tanatofórica y craneosinostosis (síndrome de Muenke).

Se realizó el estudio a 88 casos, divididos en:

1. 58 casos del periodo de 1998 a 2006 (previo a la concesión del proyecto) con la solicitud de estudio de:
  - 53 casos para el estudio de ACH y/o HCH,
  - 2 para estudio de síndrome de Muenke y/o Crouzon,
  - 2 para estudio de pseudoacondroplasia,
  - 1 para estudio de displasia tanatofórica.
2. 30 casos del periodo de 2007 a 2012 (tras la concesión del proyecto) con la solicitud de estudio de:
  - 21 casos para estudio de ACH y/o HCH,
  - 2 para displasia tanatofórica,
  - 2 para displasia ósea en general,
  - 2 para craneosinostosis,
  - 1 caso para estudio de síndrome de Crouzon,
  - 1 caso para estudio de displasia metafisaria,
  - 1 caso por presentar micromelia.

Adicionalmente se realizó el estudio de mutaciones en este gen *FGFR3* a 44 muestras con indicación de talla baja idiopática (ver estudio gen *SHOX*).

#### 3.1.3.2. Gen *FGFR2*: Estudio del síndrome de Apert y de Crouzon

Se realizó el estudio a 3 casos:

- ACH-51: se solicita estudio de síndrome de Crouzon y Muenke,
- ACH-118: lactante con sospecha de síndrome de Apert,
- ACH-332: se solicita estudio de craneosinostosis.

#### **3.1.3.3. Gen *COMP*: Estudio de pseudoacondroplasia**

En el año 2011, y ante la presencia de 5 casos con un diagnóstico clínico de pseudoacondroplasia, se decidió realizar la secuenciación del gen *COMP* en el laboratorio. El estudio se realizó en 7 casos:

- En 5 casos se solicitaba específicamente el estudio de este gen: 2 casos (ACH-64 y ACH-79) del periodo 1998-2006 y 3 (ACH-102, ACH-156 y ACH-255) del segundo periodo,
- En 2 casos para diagnóstico diferencial: ACH-119 con una displasia ósea sin filiar y ACH-210 con el diagnóstico de displasia metafisaria. Ambos del segundo periodo.

#### **3.1.3.4. Gen *SLC26A2*: Estudio de displasia epifisaria múltiple recesiva**

Ante la demanda por parte de los progenitores de completar el estudio genético comenzado en el periodo prenatal de la *probandus*, se pusieron a punto distintas técnicas para el estudio de esta familia ACH-228.

#### **3.1.3.5. Gen *RMRP*: Estudio de hipoplasia de pelo-cartílago**

La solicitud de asesoramiento genético reproductivo en el caso ACH-128 con el fin de tener descendencia no afecta, impulsó la puesta a punto de este gen. Tres años más tarde apareció un nuevo caso con diagnóstico clínico para confirmación molecular: ACH-358.

#### **3.1.3.6. Gen *SHOX*: Estudio de discondrosteosis de Léri-Weill, displasia mesomélica de Langer y talla baja idiopática**

Ante la creciente solicitud por parte de los endocrinos pediátricos de estudio del gen *SHOX* en pacientes con talla baja idiopática para ver si eran susceptibles del tratamiento con hormona de crecimiento, se introdujo el estudio de este gen en la cartera de servicios de Genética Clínica. Se realizó el estudio a 173 casos, divididos en:

1. Periodo de 1998 a 2006 (previo a la concesión del proyecto): en 28 familias con estudio de *FGFR3* negativo, 27 eran susceptibles de ampliación del estudio a gen *SHOX*, por lo que se intentó localizar al facultativo responsable/paciente para informar de esta posibilidad. Hubo 10 casos en los que no se localizó al facultativo y/o paciente y no se continuó el estudio.

En total se estudiaron 17 casos.

2. Periodo de 2007 a 2012 (tras la concesión del proyecto):

- 13 pacientes con solicitud de acondroplasia/hipocondroplasia, y estudio de *FGFR3* negativo. Se contactó con el facultativo responsable para ampliación del estudio con el gen *SHOX*.
- 80 casos con indicación de estudio del gen *SHOX*, repartidas en:
  - 56 pacientes provenían del Servicio de Pediatría del Hospital Infanta Elena todos por talla baja idiopática y requirió la ampliación de estudio a 7 familiares directos así como el estudio adicional del gen *FGFR3* en 14 *probandi*.
  - 24 pacientes provenían de la FJD y de otros hospitales: 20 casos por talla baja idiopática/familiar, otro por un antecedente familiar clínico positivo, otro por deformidad de Madelung con talla normal, otro por retraso pondoestatural y uno para ampliación de estudio tras el resultado del cariotipo. El estudio de estos pacientes conllevó la ampliación a 8 miembros familiares más así como el estudio de mutaciones en el gen *FGFR3* en 9 de los *probandi*.
- 35 pacientes con talla baja idiopática (TBI) de 31 familias valorados por el Dr. Leandro Soriano Guillén, del Servicio de Pediatría de la FJD, según los criterios de Rappold y colaboradores, previos al estudio del gen *SHOX* por el Servicio de Genética. Este estudio se realizó desde septiembre de 2011 hasta diciembre de 2012. Se realizó estudio del gen *FGFR3* adicionalmente a 19 casos. Fue necesario la ampliación del estudio a 29 familiares.
- 31 pacientes del Hospital Clínico San Carlos por talla baja idiopática con ampliación a 11 miembros familiares.

Para el análisis de los resultados y su discusión se han agrupado todos estos casos en 5 grupos, denominados de la siguiente forma:

- Grupo *FGFR3*: pacientes con primera indicación de estudio en el gen *FGFR3* que, al ser negativo, se amplió a estudio del gen *SHOX*. Constituyen 17 casos de 1998 a 2006 más 13 casos desde 2007.
- Grupo IE: los 56 pacientes enviados desde el Hospital Infanta Elena para su estudio.
- Grupo RAPPOLD: los 35 pacientes valorados por el Dr. Leandro Soriano Guillén según esta escala.
- Grupo OTROS: pacientes tanto de la FJD como de otros hospitales, pero no

del Hospital Infanta Elena, con indicación de estudio de *SHOX* pero no valorados bajo la escala de Rappold por el Dr. Leandro Soriano. 25 casos.

- Grupo HCSC: 31 casos enviados a la Sección de Genética Clínica para estudio del gen *SHOX* sin escala de Rappold.

Además se aportan los 9 casos realizados entre los años 2011 a 2013 del control externo de calidad EMQN, de sus siglas en inglés *European Molecular Genetics Quality Network*. El EMQN es un organismo sin ánimo de lucro que promueve las buenas prácticas y el buen hacer mediante guías de diagnóstico molecular y controles de calidad. En estos controles se evalúa tanto el diagnóstico por parte del laboratorio como los informes genético-clínicos realizados, marcando una puntuación final que acredita la validez del laboratorio.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Manejo clínico: escala de Rappold

La escala de Rappold define un sistema de puntos con un total de 24 en pacientes pediátricos con edad  $\geq 3$  años hasta la edad prepuberal definida como estadio puberal Tanner I en niños (testes por debajo de 4mL) y en niñas (sin botón mamario) y con una talla  $\leq 2$ SDS. Con esta escala se pretende identificar a los pacientes candidatos para estudio del gen *SHOX*. En el artículo definen dos puntos de corte:  $<4$  y  $<7$  con sensibilidades y valores predictivos positivos de 71% y 11% para el primero y de 61% y 19% para el segundo (Rappold, 2007). En la **tabla 3.3** se resumen los ítems con sus criterios y los puntos asignados:

**TABLA 3.3: criterios de Rappold (Rappold et al, 2007)**

ÍTEM	CRITERIO	PUNTOS
Relación braza/talla	$<96,5\%$	2
Relación talla sentado/talla	$>55,5\%$	2
IMC	$>P50$	4
Cubitus valgus	Sí	2
Antebrazo corto	Sí	3
Incurvación antebrazo	Sí	3
Hipertrofia de pantorillas	Sí	3
Dislocación de cúbito (codo)	Sí	5

Las tallas se obtuvieron aplicando la escala semilongitudinal de Hernández (1998).

### 3.2.2. Obtención de muestra y extracción de ADN

Hasta el 2007 la obtención de muestras y su extracción fue muy variada. En algunos casos el ADN venía ya extraído del lugar de origen; en otros eran muestras de ADN muy antiguos extraídas en el laboratorio utilizando el método salino (cloruro sódico y precipitación con etanol, *salting-out*). A continuación se describen los métodos de extracción en las muestras recibidas a partir del 2007, realizadas por esta tesis.

La obtención de muestra dependió del origen del material. Todas las extracciones de ADN, exceptuando la de ADN fetal a partir de plasma materno y la muestra de biopsia parafinada, se realizaron con el extractor automático Biorobot EZ1 (*Qiagen, Hilden Alemania*) empleando las diferentes tarjetas y reactivos específicos para cada material (ver **tabla 3.4**). A continuación se detallan cómo se obtuvieron y se procesaron hasta obtener el material necesario para introducirlo en el extractor automático.

#### 3.2.2.1. Restos abortivos

De las 29 muestras, 28 eran procedentes de restos frescos y 1 de resto parafinado.

##### 3.2.2.1.1. Restos abortivos frescos.

En aquellos casos en los que era posible, se obtenían muestras de distintas zonas del feto, destacando los restos placentarios, el cordón y el músculo esquelético de la pantorrilla.

Procedimiento: se parte de aproximadamente 20 mg de tejido y se disgrega mecánicamente con el bisturí y las pinzas esterilizadas en una placa de Petri. El material se lava con 20  $\mu$ L de suero fisiológico (NaCl 0,9%) extrayendo el suero de lavado con una pipeta de Pasteur. Este proceso se realiza 3 veces. Se transfiere el material limpio a un tubo de 2 mL y se añade 1 mL de suero. Se centrifuga 10 minutos a 11.000 rpm y al finalizar se extrae el líquido sobrenadante con una pipeta de Pasteur. A continuación se añaden 10  $\mu$ L de proteinasa K y 190  $\mu$ L de buffer G2 (*Qiagen, Hilden, Alemania*). Se da un pulso de vórtex y se incuba en la estufa a 56°C durante al menos 2 horas. Se realizan pulsos de vórtex cada 30 minutos. Cuando está totalmente digerido el tejido (solución homogénea) está preparado para introducirlo en el extractor automático.

##### 3.2.2.1.2. Resto abortivo parafinado

Se parte de cortes parafinados realizados con microtomo de 5-10  $\mu$  que se transfieren a tubos eppendorf de 1,5 mL. Se añade 1 mL de xilol y se homogeneizan las muestras durante 10 segundos en vórtex. Se centrifuga a 13.000rpm durante 3 minutos y se extrae el líquido sobrenadante con una pipeta de Pasteur. Se repite este paso. Se añade un 1 mL de etanol absoluto y se mezcla en vórtex. Se cen-

trifuga a 13.000 rpm durante 3 minutos y se extrae el líquido sobrenadante con una pipeta de Pasteur. Se deja el tubo abierto para evaporar el etanol residual a temperatura ambiente durante unos 10 minutos. Se resuspende el *pellet* en 180 µL de buffer ATL (*Qiagen, Hilden, Alemania*) y se añade 20 µL de proteinasa K. Se da un pulso de vórtex y se incuba en la estufa a 56°C durante 1 hora. Se saca de la estufa y se lleva a un termobloque a 90°C durante otra hora. Cuando está totalmente digerido el tejido (solución homogénea) se extrae el ADN con el biorobot QIAcube con el protocolo QIAmp DNA FFPE Tissue (*Qiagen Hilden, Alemania*).

### **3.2.2.2. Estudios prenatales**

Las muestras estudiadas provenían de distintos tejidos:

- 28 de vellosidades coriales obtenidas por biopsia de corion vía vaginal, principalmente, o transabdominal, realizadas entre la semana 9 y la 20 de gestación.
- 41 de amniocitos de líquidos amnióticos obtenidos por amniocentesis realizadas entre la semana 15 y la 35 de gestación.
- 5 de ADN fetal a partir de sangre periférica de la gestante obtenidos entre la semana 9 y la 35 de gestación.

#### **3.2.2.2.1. Vellosoidad corial**

La biopsia obtenida se pone en una placa de Petri y se lava con 1 mL de suero fisiológico (NaCl 0,9%) retirando el líquido con una pipeta de Pasteur. Este proceso se realiza dos veces. Una vez limpia se transfiere a otra placa de Petri donde se trocea con ayuda de un bisturí y unas pinzas. Se recogen los restos con la pipeta de Pasteur y se transfieren a un tubo de 2 mL. Se añaden 10 µL de proteinasa K y 190 µL de Buffer G2 (*Qiagen, Hilden, Alemania*), se mezcla con vórtex y se incuba en una estufa a 56°C por, al menos, 1 hora. Cuando está totalmente digerido el tejido (solución homogénea) está preparado para introducirlo en el extractor automático.

#### **3.2.2.2.2. Líquido amniótico (amniocitos)**

Se transfieren 1,5 mL de líquido amniótico a un tubo de 2 mL y se centrifuga durante 10 minutos a 14.000 rpm. Una vez finalizado, se decanta el sobrenadante y se añaden 10 µL de proteinasa K y 190 µL de Buffer G2 (*Qiagen, Hilden, Alemania*), se mezcla con vórtex y se incuba en una estufa a 56°C unos 15 minutos. Cuando termina este paso está preparado para introducirlo en el extractor automático.

Esta forma de extracción tanto de vellosoidad como de amniocitos se denomina directa porque partimos de la muestra inicial recién extraída. Normalmente tanto la vellosoidad como el líquido amniótico se ponen a cultivo. De este cultivo también se puede extraer más ADN para aumentar la cantidad de muestra disponible para estudios adicionales.



### 3.2.2.2.3. Cultivo celular

Se decanta el medio de cultivo del tubo biselado. Se lava dos veces con medio de cultivo. Se añade 1 mL de tripsina. Se incuba en la estufa de 37°C durante 10 minutos aproximadamente. Al cabo de este tiempo se observa el cultivo en el microscopio invertido para ver si se han despegado suficientes células del tubo de cultivo. Si no son suficientes, se vuelve a incubar en la estufa de 37°C. Cuando ya sean suficientes se añade 1 mL de medio para neutralizar la actividad de la tripsina. Se recogen los 2 mL sobrenadantes y se transfieren a un tubo de 2 mL que se centrifuga durante 10 minutos a 14.000 rpm. Una vez finalizado se decanta el sobrenadante y se añaden 10 µL de proteinasa K y 190 µL de Buffer G2 (*Qiagen, Hilden, Alemania*), se mezcla con vórtex y se incuba en una estufa a 56°C 15 minutos. Cuando termina este paso está preparado para introducirlo en el extractor automático.

### 3.2.2.2.4. ADN fetal a partir de plasma materno

Se extraen dos tubos de sangre con EDTA y se centrifugan a 1.600 rpm durante 10 minutos. En campana estéril, el sobrenadante (plasma) se transfiere a varios tubos Eppendorf de 1,5 mL y se centrifugan a 14.000rpm durante 10 minutos. El nuevo sobrenadante se transfiere a nuevos tubos Eppendorf de 1,5 mL y se extrae el ADN (tanto materno como fetal) de forma automática con el robot QIAcube (*Qiagen, Hilden, Alemania*) empleando las columnas QIAamp DNA Blood Mini Kit.

## 3.2.2.3. Estudios postnatales

En el 95,8% de los casos se obtuvo una muestra de sangre periférica por punción venosa. En el 4,2% restante de ADN de células bucales.

### 3.2.2.3.1. Sangre periférica

Se extrae sangre del paciente en un tubo con anticoagulante EDTA y se transfieren 350 µL a un tubo de 2 mL que se introduce directamente en el extractor.

### 3.2.2.3.2. Células bucales

Se recogen las células bucales con una torunda/escobilla (*Buccal Swab Brushes, Epicentre*) que se pasa por el interior de ambas mejillas del paciente. Se corta la parte de la escobilla y se introduce en un tubo de 2 mL donde se añaden 10 µL de proteinasa K y 190 µL de Buffer G2 (*Qiagen, Hilden, Alemania*), se mezcla con vórtex y se incuba en una estufa a 56°C durante toda la noche. Al día siguiente se elimina la escobilla y el tubo ya está preparado para introducirse en el extractor automático.

**Tabla 3.4: El ADN fue extraído de muestras procedentes de distintos tejidos siguiendo las indicaciones del fabricante con el BioRobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania)**

MUESTRA	TARJETA	REACTIVO
<i>Resto abortivo fresco</i>	EZ1 DNA Tissue Card	EZ1 DNA Tissue Reagent Cartridges kit
<i>Vellosidad corial</i>	EZ1 DNA Tissue Card	EZ1 DNA Tissue Reagent Cartridges kit
	EZ1 DNA Blood Card con paso con EtOH	EZ1 DNA Blood Reagent Cartridges 350 µL kit
<i>Líquido amniótico directo</i>	DNA forensic Card	Forensic 350 µL Reagent Cartridges
<i>Cultivo celular</i>	EZ1 DNA Blood Card con paso con EtOH	EZ1 DNA Blood Reagent Cartridges 350 µL kit
<i>Sangre periférica</i>	EZ1 DNA Blood Card (hasta el año 2010)	EZ1 DNA Blood Reagent Cartridges 350 µL kit
	EZ1 DNA Blood Card con paso con EtOH	EZ1 DNA Blood Reagent Cartridges 350 µL kit
<i>Células bucales</i>	EZ1 DNA Tissue Card	EZ1 DNA Tissue Reagent Cartridges kit

### 3.2.3. Cuantificación de ADN

En las muestras prenatales y de restos abortivos, así como en aquellos casos de estudios postnatales en los que era necesario, se procedía a la cuantificación del ADN mediante el empleo del espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.2.4. Estudios realizados

#### 3.2.4.1. Restos abortivos

Se intentó obtener la información del cariotipo fetal en todos los abortos, bien porque ya estaban realizados previamente o bien porque se cultivaban estos restos en la Sección de Citogenética del Servicio de Genética de la FJD, independientemente de si se había solicitado o no en la petición. La obtención del cariotipo se realizó siguiendo los protocolos establecidos en esta sección. En las muestras en las que el cultivo no progresaba, era insuficiente o de mala calidad para estudio citogenético se realizaba estudio FISH (hibridación fluorescente *in situ*) o QF-PCR (microsatélites STRs) de las aneuploidías más frecuentes también en esa misma sección. Del mismo modo, y siguiendo el protocolo establecido por esa sección para abortos, se decidió realizar la técnica de MLPA para las regiones subteloméricas de los brazos cortos y largos de todos los cromosomas en el aborto de la familia ACH-121.

Independientemente del estudio específico solicitado, a las 28 muestras en las que se indicaba el estudio de *FGFR3* se les realizó el estudio de los exones 7, 9, 12, 13, 14 y 18, donde se encuentran la gran mayoría de las mutaciones descritas. En el año 2012 se diseñan unos nuevos cebadores para el exón 7 que lo amplifican en su totalidad y así aumentar la sensibilidad del estudio.

Al aborto correspondiente a la familia ACH-71 se solicitaba estudio del síndrome de Apert, por lo que se realizó el estudio del exón 8 del gen *FGFR2*.

Se recogió la edad paterna en todos los casos que se tuvo acceso.

#### 3.2.4.2. Estudios prenatales:

Del mismo modo que las muestras de restos abortivos, las muestras prenatales tenían información del cariotipo fetal, por haberse realizado en el lugar de origen o en la Sección de Citogenética del Servicio de Genética de la FJD, independientemente de si se había solicitado o no en la petición. Dada la presencia de una patología fetal en el embarazo en curso o en uno anterior que conlleva una alta ansiedad en los progenitores, a todas las muestras se les realizó un estudio semicuantitativo por QF-PCR para descartar las aneuploidías más frecuentes (13, 18, 21, X e Y).

De las 74 muestras de las que se partía, en 71 casos se solicitaba el estudio de *FGFR3*:

- A 34 muestras prenatales de embarazos en curso que presentaban al menos rizomelia se les realizó el estudio de los exones 7, 9, 12, 13, 14 y 18 del gen *FGFR3*, independientemente de lo solicitado en la petición. Tres de estas muestras provenían de gestaciones con seguimiento en el Hospital Clínico San Carlos.
- A 13 muestras prenatales con estudio molecular positivo en los progenitores o en familiares directos del gen *FGFR3* se realizó el estudio concreto de esta mutación: 9 estudios para ACH (Gly380Arg), 3 para TD-I (2 para la mutación Arg248Cys y 1 para Ser249Cys) y 1 para el síndrome de Muenke (Pro250Arg).
- A 11 muestras con embarazo anterior interrumpido por displasia ósea pero sin estudio molecular confirmatorio, se les realizó el estudio de los exones 7, 9, 12 y 13 del gen *FGFR3* si en este antecedente no se contemplaba una displasia ósea letal o no presentaba hipoplasia de tórax (9 casos). En los casos (3) en los que sí se contemplaban formas letales, se amplió el estudio a los exones 14 y 18.
- A 9 muestras de embarazos en curso con clínica heterogénea: displasia ósea que no implicaba micromelia, CIR, tratamientos con corticoides en la madre, se les realizó el estudio de los exones 9, 12 y 13 del gen *FGFR3*.
- A 3 muestras de ADN fetal para estudio molecular de ACH (p.Gly380Arg) al presentar alteraciones ecográficas en el segundo trimestre compatibles con esta patología y progenitores no afectados, se les realizó una minisecuenciación para la detección de esta mutación.
- A 1 muestra prenatal de embarazo en curso con diagnóstico de craneosi-

nostosis y estudios negativos para ACH y HCH en otro hospital, se le analizó el exón 7.

A partir del año 2012 para el exón 7 se utilizaron los nuevos cebadores y se valoró la repetición del algún caso anterior con una clínica más sugerente.

Se recogió la edad paterna en todos los casos en los que se obtuvo acceso.

A las tres muestras restantes hasta las 74 totales, se les solicitó estudio concreto con mutación conocida: dos muestras de ADN fetal para el gen *RMRP*, para el cual se desarrolló una minisequenciación, y una muestra para estudio del gen *SHOX* por el resultado obtenido en el cariotipo fetal (ACH-152).

### **3.2.4.3. Estudios postnatales**

#### **3.2.4.3.1. Gen *FGFR3***

A las 58 familias previas a la concesión del proyecto se analizaron los exones 7, 9, 12, 13 y 14 del gen *FGFR3*, a la familia con síndrome de Muenke y a las 2 con síndrome de Crouzon los exones 7 y 9, y a la petición de displasia tanatofórica el estudio de los exones 7, 9, 12, 13, 14 y 18.

A las 30 familias tras la concesión del proyecto se realizó: 1) a las 25 muestras con solicitud de estudio ACH y/o HCH, displasia ósea en general y micromelia prenatal, el análisis de los exones 7, 9, 12, 13 y 14; 2) a las 2 muestras con solicitud de estudio de displasia tanatofórica y aquella con sospecha de displasia metafisaria, los anteriores y el exón 18; 3) a la familia con síndrome de Crouzon y a las 2 con diagnóstico clínico de craneosinostosis (3 casos por familia) los exones 7 y 9.

A partir del año 2012 para el exón 7 se utilizaron los nuevos cebadores y se valoró la repetición de algún caso anterior con una clínica más sugerente.

Se recogió la edad paterna en todos los casos en los que se obtuvo acceso.

A los 44 pacientes para estudio de *SHOX* por el diagnóstico de talla baja idiopática que presentaban un fenotipo disarmónico, se les realizó el estudio de los exones 7, 9, 12, 13 y 14 del gen *FGFR3*. De estos 44 pacientes, 14 provenían del Hospital Infanta Elena, 21 eran los pacientes de la serie de Rappold valorados por el Dr. Leandro Soriano Guillén (FJD) y 9 eran pacientes de otros hospitales o de la propia FJD pero no valorados por el Dr. Leandro Soriano.

#### **3.2.4.3.2. Gen *FGFR2***

Se realizó el estudio de los exones 8, 9 y 10 de este gen a los 3 casos con sospecha de patología en *FGFR2*. Se amplió el estudio a 2 familiares de los casos ACH-51 y ACH-118.

#### 3.2.4.3.3. Gen *COMP*

Se realizó el estudio de los exones 10, 13 y 14 del gen *COMP* en los 7 pacientes con sospecha de pseudoacondroplasia.

#### 3.2.4.3.4. Gen *SLC26A2*

Se realizó el estudio del exón 3 de este gen a la *probandus* y sus dos progenitores. Además se realizó estudio de segregación con 21 microsatélites STRs ubicados a lo largo de todo el cromosoma 5 y una PCR a tiempo real con el análisis de alta resolución de fusión (técnica HRM) a las 3 muestras de esta familia.

#### 3.2.4.3.5. Gen *RMRP*

Se realizó el estudio del único exón no codificante del gen *RMRP* así como 350 pb en la región 5' y 50 pb en región 3'. El estudio completo se realizó a los dos *probandi* y se comprobaron las mutaciones encontradas en sus progenitores.

#### 3.2.4.3.6. Gen *SHOX*

El estudio del gen *SHOX* se realizó mayoritariamente mediante la técnica de MLPA. Para esta técnica se requiere un ADN de partida con una baja concentración de sales y una concentración mínima de 50 µL. La extracción de ADN en el Laboratorio de Genética de la FJD se realizó hasta el 2004 mediante el método salino y a partir del 2004 con el extractor automático Biorobot EZ1 (*Qiagen, Hilden Alemania*) empleando la tarjeta y reactivos específicos. El ADN obtenido por estos dos métodos no es aceptable para la técnica de MLPA por lo que el estudio del gen *SHOX* en estas muestras se realizó mediante QF-PCR usando STRs. A partir de 2009, Qiagen incorpora a la extracción de ADN a partir de sangre periférica un paso adicional de precipitación con etanol al 80% por lo que desde entonces el estudio de este gen se realizó mediante la técnica de MLPA. A aquellos casos que por sus características así lo requirieron, también se les realizó el estudio por STRs.

De la división realizada en la sección de pacientes, el número de pruebas realizadas quedaría de la siguiente forma:

- Periodo de 1998 a 2006: 17 estudios realizados mediante STRs. A 8 de ellos además se les realizó MLPA y en 2 casos también se procedió a la secuenciación del gen *SHOX*. Una familia requirió el estudio en dos miembros familiares para estudio indirecto (STRs).
- Periodo de 2007 a 2012:
  - A los 13 pacientes con estudio *FGFR3* negativos se les realizó el estudio mediante MLPA. A 5 de ellos se les amplió el estudio mediante STRs y a otros 3, también se les secuenció el gen *SHOX*.
  - De las 80 familias con estudio del gen *SHOX*:

- A las 56 familias del Hospital Infanta Elena se les realizó el estudio mediante MLPA. A los tres primeros casos se les amplió el estudio con marcadores STRs, con la participación de 5 familiares. A otro caso se le secuenció el gen *SHOX* por completo.
- A las 22 familias restantes se les realizó: a 20 casos estudio de MLPA que conllevó al estudio adicional de 5 familiares. A 7 casos, se les amplió el estudio con marcadores STRs utilizando 6 miembros familiares, y en 5 casos además se secuenció el gen.
- A la serie de 35 pacientes evaluados por el Dr. Leandro Soriano Guillén según la escala de Rappold, se les realizó a todos ellos el estudio mediante la técnica de MLPA junto a 23 miembros familiares. A 20 *probandi* se les amplió el estudio mediante STRs junto a 28 familiares y se secuenció el gen *SHOX* a los 35 *probandi*.
- Tanto a los 31 pacientes del HCSC como a 11 casos se les estudió mediante la técnica de MLPA. A 2 familias (7 casos totales) además se amplió el estudio de forma indirecta por STRs y a otra familia compuesta por *probandus* y los progenitores se les secuenció el exón 3.

En la participación en el control externo de calidad EMQN se estudiaron 3 casos por año: en el año 2011 las tres muestras fueron estudiadas por MLPA. En los años 2012 y 2013 las técnicas utilizadas fueron MLPA y secuenciación del gen *SHOX*.

### **3.2.5. Técnicas moleculares: análisis directos**

#### **3.2.5.1. Secuenciación sanger**

Para este estudio directo se realiza una primera amplificación de la región de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita por Kary Mullis, de *Cetus Corporation*, en 1985 (Saiki, 1985; Mullis & Faloona, 1987). Los cebadores utilizados así como las condiciones de reacción se listan a continuación. La amplificación se realizó en un termociclador 2720 Thermal Cycler (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

Una vez realizada esta primera PCR de amplificación se comprobó el éxito de la misma testando 5 µL del producto amplificado en un gel de agarosa al 3%. A continuación se purificaron estas regiones amplificadas para eliminar tanto restos de reactivos como de ADN genómico mediante las columnas del kit EZNA® Cycle-Pure (*Omega-Biotech*) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tras la purificación, se realizó la reacción de secuenciación propiamente dicha con el reactivo ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit, *Applied Biosystem*, que incorpora como reactivos dNTPs (90%), ddNTPs (10%), tampón de la Taq polimerasa a 1X con 15 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1U de AmpliTaq Gold polime-

rasa. Las condiciones de reacción se muestran en la **tabla 3.5**.

**Tabla 3.5: condiciones de reacción de secuenciación**

CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 20 $\mu$ L				
Reactivo	Concentración inicial	Volumen ( $\mu$ L)	Temperatura	Tiempo
BigDye v1.1	2,5X	3	95°C	5 min
Cebadores F ó R	10 pmol/ $\mu$ L	0,5	95°C	5 s
ADN purificado		5	50°C	10 s    25x
Agua estéril (Braun)		11,5	72°C	4 min
			72°C	20 min
			4°C	$\infty$

La purificación de la reacción de secuenciación se realizó con las columnas SEPHADEX Centri-Sep (*Princeton Separation, NJ, USA*) para eliminar los restos de reactivos de la reacción de secuenciación. Y por último se colocó todo el producto purificado con 18  $\mu$ L de formamida ultrapura (*Applied Biosystem, Foster City, CA, USA*) en un pocillo de placa de 96 para ser analizado mediante electroforesis capilar en un autoanalizador automático 3130XL Genetic Analyzer (*Applied Biosystem, Foster City, CA, USA*) con el programa informático Sequencing Analysis v.5.2.

### 3.2.5.1.1. Gen *FGFR3*

Para la amplificación de los fragmentos codificantes se partió de la referencia bibliográfica de Bellus, 1996, para el exón 7; de Shiang, 1994, para el 9; de Bellus, 1995, para el exón 12 y 13; de Tavormina, 1995, para el 14; y de Rousseau, 1995, para el 18; con las modificaciones necesarias en función de los requerimientos del laboratorio. En las **figuras 3.2 a 3.6** se muestran las localizaciones de los cebadores en los fragmentos amplificados y los tamaños. En las **tabla 3.6 a 3.10** se especifican las mutaciones descritas en cada fragmento, los cebadores utilizados y las condiciones de reacción. Las secuencias de referencia son NG\_012632.1, NM\_000142.4 y NP\_000133.1 que corresponde a la variante FGFR3-203 de *Ensembl*.



Figura 3.2: Secuencia del exón 7 del gen FGFR3

GTCGTGGAGAACAAAGTTTGGCAGCATCCGGCAGACGTACACGCTGGACGTGCTGGGT  
GAGGGCCCTGGGGCGGCGGGGGGTGGGGGCGGCAGTGGCGGTGGTGGTGAGGGAGGGG  
GTGGCCCTGAGCGTCATCTGCCCCACAG

1 2 3 4

740 AG CCG TCC CCG CAC CGG CCC ATC CTG CAG GCG GGG CTG CCG GCC AAC  
248 Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn  
5 6 7 8

CAG ACG GCG GTG CTG GGC AGC GAC GTG GAG TTC CAC TGC AAG GTG TAC AGT  
Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys Val Tyr Ser  
9 10

GAC GCA CAG CCC CAC ATC CAG TGG CTC AAG CAC GTG GAG GTG AAT GGC AGC  
Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val Asn Gly Ser

AAG GTG GGC CCG GAC GGC ACA CCC TAC GTT ACC GTG CTC AAG 930  
Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu Lys 309  
GTGGGCCACCGTGTGCACGTGGGTGCCCGCTGGGGCTCCTGGGCTGGCCCCAAGGGTGC  
CCCTTGCTGCGG GTTGGCTGAGGATTGGGT

GTT: secuencia de cebadores - GTT: secuencia antigua - TGG: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

Tabla 3.6: Mutaciones descritas en la base de datos HGMD®, cebadores y condiciones de reacción para el exón 7 del gen FGFR3

MUTACIONES DESCRITAS				CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 50µL				
	Codon	Nucleótido	Ref Bibliográfica	F (5'-3'):	Concentración inicial	Volumen (µL)	Temperatura	Tiempo
ACH	(8) Ser279Cys	c.835A>T	Heuertz, 2006	GTCGTGGAGAACAAAGTTTG	10X+2mM	5	95°C	10 min
	(4) Asn262His	c.784A>C	Heuertz, 2006	R (5'-3'):	1,25µM	8	95°C	30 s
HCH	(5) Thr264Met	c.791C>T	Song, 2012	ACCCAAATCCTCACGCAAC	10 pmol/µL	2/2	58°C	30 s
	(6) Gly268Cys	c.802G>T	Heuertz, 2006		5X	10	72°C	45 s
	(7) Tyr278Cys	c.833A>G	Heuertz, 2006		50 ng/µL	2	72°C	10 min
TD-I	(10) Gly295Cys	c.883G>T	Baujat, 2008		5 U/µL	0,5	4°C	∞
	(1) Arg248Cys	c.742C>T	Tavormina, 1995		Agua estéril (Braun)	20,5		
Craneosinostosis (Sd. Muenke)	(2) Ser249Cys	c.746C>G	Tavormina, 1995-bis					
	(3) Pro250Arg	c.749C>G	Bellus, 1996					
	(3) Pro250Leu	c.749C>T	Schindler, 2002					
	(9) Pro283Thr	c.847C>A	Rosciolo, 2013					

Tamaño del amplificado de 430pb

F: secuencia Forward - R: secuencia Reverse - Th: temperatura de hibridación

Figura 3.3: Secuencia del exón 9 del gen FGFR3

1082 AG GAG CTG GTG GAG GCT GAC GAG GCG GGC AGT GTG TAT GCA GGC ATC  
362 Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Ile  
5 6 7 8 9

CTC AGC TAC GGG GTG GGC TTC TTC CTG TTC ATC CTG GTG GTG GCG GCT GTG  
Leu Ser Tyr Gly Val Gly Phe Phe Leu Phe Ile Leu Val Val Ala Ala Val  
10

ACG CTC TGC CGC CTG CGC AGC CCC CCC A AG AAA GGC CTG GGC TCC CCC ACC  
Thr Leu Cys Arg Leu Arg Ser Pro Pro Lys Lys Gly Leu Gly Ser Pro Thr

GTG CAC AAG ATC TCC 1245  
Val His Lys Ile Ser 415

GTT: secuencia de cebadores - TGG: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante



MUTACIONES DESCRITAS			
	Codon	Nucleótido	Ref Bibliográfica
ACH	(4) Gly375Cys	c.1123G>T	Ikegawa,1995
	(6) Gly380Arg	c.1138G>A	Shiang, 1994
	(6) Gly380Arg	c.1138G>C	Shiang, 1994
	(5) c.1130_1138delTCAGCTA GginsGCAGCTACA		Rump, 2006
HCH	(10) Thr394Ser	c.1180A>T	Zhu, 2003
	(5) Gly380Asn	c.1138_1139delGginsAA	Santos, 2007
	(7) Val381Glu	c.1142T>A	Heuertz, 2006
TD-I	(1) Tyr370Cys	c.1108G>T	Rousseau, 1996
	(2) Tyr371Cys	c.1111A>T	Tavormina, 1995
	(3) Tyr373Cys	c.1118A>G	Rousseau, 1996
Displasia esquelética	(8) Phe384Leu	c.1150T>C	Trujillo-Tiebas, 2004
Sd de Crouzon con acantosis nigricans	(9) Ala391Glu	c.1172C>A	Meyers, 1995

CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 50 µL					
F (5'-3'):		AGGAGCTGGTGAGGCTGA		R (5'-3'): GGAGATCTTGTCACGGTGGG	
				Th=65°C	
Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µL)	Temperatura Tiempo		
Tampón Con MgCl2	10X+2mM	5	95°C	10 min	
dNTPs	1,25µM	8	95°C	45 s	
Cebadores F/R	10 pmol/µL	2/2	65°C	30 s	35x
GCRich (Roche)	5X	10	72°C	1 min	
ADN problema	50 ng/µL	2	72°C	10 min	
FastStar Taq polimerasa (Roche)	5 U/µL	0,5	4°C	∞	
Agua estéril (Braun)	----	20,5			
Tamaño del amplificado de 163 pb					
F: secuencia Forward - R: secuencia Reverse - Th: temperatura de hibridación					

1544 ACT GAC AAG GAC CTG TCG TCG GAC CTG GTG TCT GAG ATG GAG ATG ATG AAG  
515 Tyr Asp Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys

1                  2 3                      4

ATG ATC GGG AAA CAC AAAA AC ATC ATC AAC CTG CTG GGC GCC TGC ACG CAG  
Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Tyr Gln

GGC G

Gly

GTAGGTGCGGTAGCGGCGGTGGTGCCGGCTGGGCGGCCCTCCTGGGCCTGGCAGCCCCGTCT

5

GAGGAGCCCCTGTCCCCAG GG CCC CTG TAC GTG CTG BTG GAG TAC GCG GCC AG  
Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys

GGT AAC CTG CGG GAG TTT CTG CGG GCG CGG CGG CCC CCG GGC CTG GAC TAC  
Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp Tyr

TCC TTC GAC ACC TGC AA 1748

Ser Phe Asp Tyr Cys Lys 583

63

Tabla 3.8: Mutaciones descritas en la base de datos HGMD®, cebadores y condiciones de reacción para los exones 12 y 13 del gen FGFR3

EXONES 12 Y 13			
MUTACIONES DESCRITAS			
	Codon	Nucleótido	Ref Bibliográfica
HCH	(1) Ile538Val	c.1612A>G	Grigelioniene, 1997
	(2) Asn540Lys	c.1619A>C	Deutz-Terlouw, 1998
	(2) Asn540Lys	c.1619A>G	Mortier, 2000
	(3) Asn540Lys	c.1620C>G	Prinos, 1995
	(3) Asn540Lys	c.1620C>A	Bellus, 1995
TD-I	(5) Val555Met	c.1663G>A	Marquis-Nicholson, 2013
Otras alteraciones	(4) Thr546Lys	c.1637C>A	Makrythanasis, 2014
CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 50 µL			
F (5'-3'):		ACTGACAAGGACCTGTCGGACC	
R (5'-3'):		TTGCAGGTGTGGAAGGAGTAGTC	
		Th=66°C	
Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µL)	Temperatura Tiempo
Tampón Con MgCl <sub>2</sub>	10X+2mM	5	95°C 10 min
dNTPs	1,25µM	8	95°C 30 s 35x
Cebadores F/R	10 pmol/µL	2/2	66°C 90 s
Gcrich	5X	1	72°C 20 min
ADN problema	50 ng/µL	2	4°C ∞
FastStar Taq polimerasa (Roche)	5 U/µL	0,5	
Agua estéril (Braun)	----	29,5	
Tamaño del amplificado de 267 pb			
F: secuencia Forward - R: secuencia Reverse - Th: temperatura de hibridación			

Figura 3.5: Secuencia del exón 14 del gen FGFR3

1875 **G ACC GAG GAC AAC GTG ATG AAG ATC GCA GAC TTC GGG CTG GCC CGG GAC**  
626 Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp  
1 2 3  
**GTG CAC AAC CTC GAC TAC TAC AAG AAG ACG ACC AAC**  
Val His Asn Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn  
GTGAGCCCGGCCCTGGGGTGGCGGGGGTGGGGGTCATGCCAGTAGGACGCCTGGCGCCAACA  
CCGCCTTCCCACACCCCTCCCAGGGC CGG CTG CCC GTG AAG TGG ATG GCG CCT GAG  
**GCC TTG TTT GAC CGA GTC TAC ACT C** 2016  
672  
**GTG**: secuencia de cebadores - **TGG**: región codificante (exón) - **C**: mutaciones descritas - **GTG**: secuencia no codificante

Tabla 3.9: Mutaciones descritas en la base de datos HGMD®, cebadores y condiciones de reacción para el exón 14 del gen FGFR3

EXÓN 14			
MUTACIONES DESCRITAS			
	Codon	Nucleótido	Ref Bibliográfica
HCH	(3) Lys650Asn	c.1950G>C	Bellus, 2000
	(3) Lys650Asn	c.1950G>T	Bellus, 2000
	(1) Lys650Gln	c.1948A>C	Bellus, 2000
TD-I	(2) Lys650Met	c.1949A>T	Kitoh, 1998
TD-II	(1) Lys650Glu	c.1948A>G	Tavormina, 1995
Acantosis nigricans	(2) Lys650Thr	c.1949A>C	Berk, 2007
SADDAN	(2) Lys650Met	c.1949A>T	Bellus, 1999
	(2) c.1949_1951delAGAGinsTGC		Manickam, 2014
CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 50 µL			
F (5'-3'):		GACCGAGGACAACGTGATGAA	
R (5'-3'):		GAGTGTATCGGTCAAACAAGG	
		Th=65°C	
Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µL)	Temperatura Tiempo
Tampón Con MgCl <sub>2</sub>	10X+2mM	5	95°C 10 min
dNTPs	1,25µM	8	95°C 30 s 35x
Cebadores F/R	10 pmol/µL	2/2	65°C 90 s
GCRich (Roche)	5X	5	72°C 10 min
ADN problema	50 ng/µL	2	4°C ∞
FastStar Taq polimerasa (Roche)	5 U/µL	0,5	
Agua estéril (Braun)	----	25,5	
Tamaño del amplificado de 226 pb			
F: secuencia Forward - R: secuencia Reverse - Th: temperatura de hibridación			

Figura 3.6: Secuencia del exón 18 del gen FGFR3

2286 C CTG TCG GCG CCT TTC GAG CAG TAC TCC CCG GGT GGC CAG GAC ACC CCC  
 761 Lys Ser Ala Pro Phe Glu Gln Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro  
 AGC TCC AGC TCC TCA GGG GAC GAC TCC GTG TTT GCC CAC GAC CTG CTG CCC  
 Ser Ser Ser Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro  
 1 2 3  
 CCG GCC CCA CCC AGC AGT GGG GGC TCG CGG ACG TGA 2421  
 Pro Ala Pro Pro Ser Ser Gly Gly Ser Arg Tyr \* 807  
 AGGGCCACTGGTCCCCAACAATGTGAGGGGTCCCTAGCAGCCCCACCCTGCTGCTGGTG  
 GTT: secuencia de cebadores - TGG: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

Tabla 3.10: Mutaciones descritas en la base de datos HGMD®, cebadores y condiciones de reacción para el exón 18 del gen FGFR3

EXÓN 18				CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 50 µL				
MUTACIONES DESCRITAS				F (5'-3'): CCTGTGGCGGCTTCGAGCAGTAC R (5'-3'): CACCAGCAGGGTGGCGCTGCTAG Th=70°C				
TD-I	Codon	Nucleótido	Ref Bibliográfica	Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µL)	Temperatura	Tiempo
	(1) *807Arg	c.2419T>A	Rousseau, 1995	Tampón Con MgCl2	10X+2mM	5	95°C	10 min
	(3) *807Cys	c.2421A>C	Passos-Bueno, 1999	dNTPs	1,25µM	8	95°C	30 s
	(3) *807Cys	c.2421A>T	Rousseau, 1995	Cebadores F/R	10 pmol/µL	2/2	70°C	30 s
	(1) *807Gly	c.2419T>G	Rousseau, 1995	GCRich (Roche) ADN	5X	15	72°C	10 min
	(2) *807Leu	c.2420G>T	Passos-Bueno, 1999	problema FastStar Taq polimerasa (Roche)	50 ng/µL	4	4°C	∞
	(2) *807Ser	c.2420G>C	Baujat, 2008					
	(3) *807Trp	c.2421A>G	Passos-Bueno, 1999	Agua estéril (Braun)	---	13,5		
				Tamaño del amplificado de 194 pb				
				F: secuencia Forward - R: secuencia Reverse - Th: temperatura de hibridación				

## 3.2.5.1.2. Gen FGFR2:

Según la variante FGFR2-001 de *Ensembl*, se amplificaron los exones 7 y 8. Las secuencias de referencia son NG\_012449.1, NM\_000141.4 y NP\_000132. Se amplificaron según los cebadores descritos por Kan (2002) modificados a los requerimientos de nuestro laboratorio, que corresponden a los exones 8 (IIIa) y 9 (IIIb) de ese artículo. En las **figuras 3.7** y **3.8** así como en la **tabla 3.11** se muestran las características de estos amplificados.

Figura 3.7: Secuencia del exón 7 del gen FGFR2

GGTCTCTCATTCTCCCATCCC CACTCCTCCTTTCTTCCCTCTCTCCACCAG  
 749 AG CGA TCG CCT CAC CGG CCC ATC CTC CAA GCC GGA CTG CCG GCA AAT GCC  
 251 Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro Ala Asn Ala  
 TCC ACA GTG GTC GGA GGA GAC GTA GAG TTT GTC TGC AAG GTT TAC AGT GAT  
 Ser Thr Val Val Gly Gly Asp Val Glu Phe Val Cys Lys Val Tyr Ser Asp  
 GCC CAG CCC CAC ATC CAG TGG ATC AAG CAC GTG GAA AAG AAC GGC AGT AAA  
 Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Ile Lys His Val Glu Lys Asn Gly Ser Lys  
 TAC GGG CCC GAC GGG CTG CCC TAC CTC AAG GTT CTC AAG 939  
 Tyr Gly Pro Asp Gly Leu Pro Trp Leu Lys Val Leu Lys 313  
 GTGAGGACTTTCTGAATCTAAAGGTACCCACAACCTGGGGTCTCCTTCATGGGT TTGGCCACA  
 GGTCTTTGATT

GTT: secuencia de cebadores - TGG: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

Figura 3.8: Secuencia del exón 8 del gen FGFR2

TCCACAATCATTCTGTGTCGTCTAGCCTTTTCTTTTGCTTCCCTTGTTTTCTAG  
 940 GCC GCC GGT GTT AAC ACC ACG GAC AAA GAG ATT GAG GTT CTC TAT ATT  
 314 Ala Ala Gly Val Asn Thr Thr Asp Lys Glu Ile Glu Val Leu Tyr Ile  
 CGG AAT GTA ACT TTT GAG GAC GCT GGG GAA TAT ACG TGC TTG GCG GGT AAT  
 Arg Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly Asn  
 TCT ATT GGG ATA TCC TTT CAC TCT GCA TGG TTG ACA GTT CTG CCA G 1084  
 Ser Ile Gly Ile Ser Phe His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro 361  
 GTATATACTGTTCTTTCTCTCTGCGTTTTTTTCCCTTTTCTTGGTTGACTGCTATAAAATTAACA  
 CAGCTTCTGTTATCAGAAATGGCCCCCTTTTATCCT

GTT: secuencia de cebadores - TGG: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

Tabla 3.11: Tipo y número de mutaciones descritas en la base de datos HGMD®, cebadores y condiciones de reacción de los exones amplificados para el gen FGFR2

TIPO Y NÚMERO DE MUTACIONES DESCRITAS		GEN FGFR2				
		CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 50µL				
	Número	Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µL)	Temperatura	Tiempo
Mutaciones puntuales	56	Tampón Con MgCl <sub>2</sub>	10X+2mM	5	94°C	5 min
Splicing	9	dNTPs	1,25µM	8	59°C	1 min
Pequeñas deleciones	6	Cebadores F/R	10 pmol/µL	1/1	72°C	1 min
Pequeñas inserciones	5	ADN problema	50 ng/µL	2	94°C	45 s
Pequeñas inserciones+deleciones	7	FastStar Taq polimerasa (Roche)	5 U/µL	0,2	T <sup>o</sup> h	40 s 35x
		Agua estéril (Braun)	----	32,8	72°C	5 min
					4°C	∞

Fragmento	Tamaño	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Th°C
Exón 7	316	5'GGTCTCTCATCTCCCATCCC3'	5'TTGGCCACAGGTCTTTGATT3'	58°C
Exón 8	300	5'TCCACAATCATTCTGTGTCGT3'	5'AGGATAAAAGGGGCCATTCT3'	59°C

Th: temperatura de hibridación

### 3.2.5.1.3. Gen COMP:

Se amplificaron los exones 10, 13 y 14 del gen *COMP* según la bibliografía con las modificaciones necesarias en función de los requerimientos del laboratorio. Para el exón 10 se tomaron las condiciones de Briggs y col (Briggs, 1995) , para el exón 13 las de Deere y col. (Deere, 1999) y para el exón 14 las del mismo autor pero de un artículo de 1998 (Deere, 1998). En las **figuras 3.9 a 3.11** y la **tabla 3.12** quedan reflejadas las características de estos amplificados. Las secuencias de referencia son NG\_007070.1, NM\_000095.2 y NP\_000086 que corresponden a la variante COMP-001 del *Ensembl*.



Figura 3.9: Secuencia del exón 10 del gen COMP

TGAGGAGTGTGACCTTTGCGTTCTCGACCTGATCTCACCCCTTAACCCACCTGTTCATCCAG  
 976 GAC AAC TGC CCG CTG GTG CGG AAC CCA GAC CAG CGC AAC ACG GAC GAG  
 326 Asp Asn Cys Pro Leu Val Arg Asn Pro Asp Gln Arg Asn Thr Asp Glu  
 GAC AAG TGG GGC GAT GCG TGC GAC AAC TGC CGG TCC CAG AAG AAC GAC GAC  
 Asp Lys Trp Gly Asp Ala Cys Asp Asn Cys Arg Ser Gln Lys Asn Asp Asp  
 CAAAAG GAC ACA GAC CAG GAC GGC CGG GGC GAT GCG TGC GAC GAC GAC ATC  
 Gln Lys Asp Thr Asp Gln Asp Gly Arg Gly Asp Ala Cys Asp Asp Asp Ile  
 GAC GGC GAC C 1135  
 Asp Gly Asp 378  
 GTGAGCTCGATGGGGGTTGGGGGGCGAGGAGAGGCGGCGGG CACCGAAGGGCGGGATTCCG  
 GCT

GTG: secuencia de cebadores - TGC: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

Figura 3.10: Secuencia del exón 13 del gen COMP

TCCCACCTATCCACTCTAG  
 1308 G GAT GGA GAC GGC CAT CAG GAC TCT CGG GAC AAC TGT CCC ACG GTG CCT  
 437 Asp Gly Asp Gly His Gln Asp Ser Arg Asp Asn Cys Pro Thr Val Pro  
 AAC AGT GCC CAG GAG GAC TCA GAC CAC GAT GGC CAG GGT GAT GCC TGC GAC  
 Asn Ser Ala Gln Glu Asp Ser Asp His Asp Gly Gln Gly Asp Ala Cys Asp  
 GAC GAC GAC GAC AAT GAC GGA GTC CCT GAC AGT CGG GAC AAC TGC CGC CTG  
 Asp Asp Asp Asp Asn Asp Gly Val Pro Asp Ser Arg Asp Asn Cys Arg Leu  
 GTG CCT AAC CCC GGC CAG GAG GAC GCG GAC A 1489  
 Val Pro Asn Pro Gly Gln Glu Asp Ala Asp 496  
 GTACGGCGGGGGCGGGCCCTGCGGTGGGGGCGGGGCCAGTGGGGGCTCCTGGCGCGGG GT  
 CTACGGTGGGCGGGC

\*GTG: secuencia de cebadores - TGC: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

Figura 3.11: Secuencia del exón 14 del gen COMP

GACTTTAGCCACCGAGGGGTCTCCACCTCTCAG  
 1490 GG GAC GGC GTG GGC GAC GTG TGC CAG GAC GAC TTT GAT GCA GAC AAG  
 497 Arg Asp Gly Val Gly Asp Val Cys Gln Asp Asp Phe Asp Ala Asp Lys  
 GTG GTA GAC AAG ATC GAC GTG TGT CCG GAG AAC GCT GAA GTC ACG CTC ACC  
 Val Val Asp Lys Ile Asp Val Cys Pro Glu Asn Ala Glu Val Thr Leu Thr  
 GAC TTC AGG GCC TTC CAG ACA GTC GTG CTG GAC CCG GAG GGT GAC GCG CAG  
 Asp Phe Arg Ala Phe Gln Thr Val Val Leu Asp Pro Glu Gly Asp Ala Gln  
 ATT GAC CCC AAC TGG GTG GTG CTC AAC CAG 1668  
 Ile Asp Pro Asn Trp Val Val Leu Asn Gln 556  
 GTGGGAGCGGGGTCCACGTGGGGGGTGATGGGACCCTAGAACCCCCACAGTGAGGCCTATG  
 CTGAGGACAGGGTGCCCTAGGGCTGTCACGGCCAGCCTGAGGCC TCCTTTCTTTGACCCC

GTG: secuencia de cebadores - TGC: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

**Tabla 3.12: Tipo y número de mutaciones descritas en la base de datos HGMD®, cebadores y condiciones de reacción de los exones amplificados para el gen COMP**

TIPO Y NÚMERO DE MUTACIONES DESCRITAS		GEN COMP				
		CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 50µL				
	Número	Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µL)	Temperatura	Tiempo
Mutaciones puntuales	75	Tampón Con MgCl <sub>2</sub>	10X+2mM	5	94°C	5 min
Splicing	1	dNTPs	1,25µM	8	95°C	45 s
Pequeñas deleciones	15	Cebadores F/R	10 pmol/µL	2/2	Th°C	90 s
Pequeñas inserciones	3	GCRich (Roche) exón 10	----	0	72°C	10 min
Pequeñas inserciones+deleciones	1	GCRich (Roche) exón 13 y 14	5X	5	4°C	∞
		ADN problema	50 ng/µL	2		
		FastStar Taq polimerasa (Roche)	5 U/µL	0,5		
		Agua estéril (Braun) exón 10	----	30,5		
		Agua estéril (Braun) exón 13 y 14	----	25,5		

Fragmento	tamaño	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Th°C
Exón 10	284	5'TGAGGAGTGTGACCTTTGCC3'	5'AGCCGAATCCCGCCCTTCGGTG3'	64°C
Exón 13	276	5'TCCACCTATCCACTCT3'	5'GCCCGCCACCGTAGAC3'	58°C
Exón 14	335	5'GACTTTAGCCACCGAG3'	5'GGGGTCAAAGAAAGGAG3'	52°C

Th: temperatura de hibridación

### 3.2.5.1.4. Gen SLC26A2:

Se diseñaron en nuestro laboratorio los cebadores para reproducir la mutación encontrada en la *probandus* c.835C>T; p.Arg279Trp, en el exón 3 del gen *SLC26A2*. Las secuencias de referencia son NG\_007147.2, NM\_000112.3 y NP\_000103.2 correspondiente al transcripto SLC26A2-001 de *Ensembl*. En la **figura 3.12** se muestran el fragmento amplificado y la mutación de la *probandus*. En la **tabla 3.13** se muestran las condiciones de trabajo.

**Figura 3.12: Secuencia del exón 3 del gen SLC26A2**

ACACTTCTATATCCTTCCTTCCAG  
 700 GTA GCG ATG GGC TTC TTT CAA GTG GGT TTT GTT TCT GTC TAC CTC TCA GAT  
 234  
 GCC TTG CTG AGT GGA TTT GTC ACT GGT GCC TCC TTC ACT ATT CTT ACA TCT CAG  
 GCC AAG TAT CTT CTT GGG CTC AAC CTT CCT CCG ACT AAT GGT GTG GGC TCA  
 CTC ATC ACT ACC TGG ATA CAT GTC TTC AGA AAC ATC CAT AAG ACC AAT CTC TGT  
 GAT CTT ATC ACC AGC CTT TTG TGC CTT TTG GTT CTT TTG CCA ACC AAA GAA CTC  
 AAT GAA CAC TTC AAATCC AAG CTTA

GT: secuencia de cebadores - TGG: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

**Tabla 3.13: Los cebadores y las condiciones de reacción del exón 3 del gen SLC26A2**

Exón 3 del gen SLC26A2		CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 50µL			
Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µL)	Temperatura	Tiempo	
Tampón Con MgCl <sub>2</sub>	10X+2mM	5	94°C	5 min	
dNTPs	1,25µM	8	94°C	30 s	
Cebadores F/R	10 pmol/µL	2/2	56°C	45 s	35x
ADN problema	50 ng/µL	2	72°C	45 s	
FastStar Taq polimerasa (Roche)	5 U/µL	0,5	72°C	10 min	
Agua estéril (Braun)	----	30,5	4°C	∞	

Fragmento	Tamaño	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Th°C
Exón 3	313	5'ACACTTCTATATCCTTCCTTCCA3'	5'CTTGTAAGTTTAGGTTGCAAT3'	56°C

Th: temperatura de hibridación

3.2.5.1.5. Gen *RMRP*:

Se diseñaron en nuestro laboratorio los cebadores para la amplificación en tres fragmentos del único exón de 264 pb del gen *RMRP* junto a 250pb en la región 5' y 100pb en la región 3'. En la **figura 3.13** se muestran los fragmentos amplificados y en la **tabla 3.14** las condiciones de trabajo y el número y tipo de mutaciones que se puede detectar con estos amplificados. La secuencia de referencia es NG\_01704.1.

Figura 3.13: Secuencia del gen *RMRP*

GAAGCGGTCCGGCATTGGCCG GCGGCCCAACGCGCACGCGCAGCAGGCCGGCC  
GGCTCCGGGGAGGCCACGCCCACTCCCCGTAGGGCGGGCCAGACCATATTTGCATAAGA  
TAGTGTCATTCTAGCTTTCCTGTATTTGTTCAATTCGTGTCATTAGCTATTCTGCTAGCCAC  
AATGCCTCTGAAAGCCTATAGTCTTAGAAAAGTTATGCCCGAAAACGGTTTTTTTAAATCTCAC  
GCCACCAACTTTTCACCCCTAATCATAAAACACAATTTCTTTAGGGCTATAAAATACTACTC  
TGTGAAGCTGAGGACGTG  
GTTCGTGCTGAAGGCCTGTATCCTAGGCTACACACTGAGGACTCTGTTCCCTCCCTT  
TCGCGCTAGGGGAAAGTCCCGGACCTCGGGCAGAGAGTGCCACGTGCATACGCAC  
GTAGACATTCCCGCTTCCCACTCCAAAGTCCGCCAA GAAGCGTATCCCGCTGAGCG  
GCGTGCGCGGGGGCGTCATCCGTCAGCTCCCTCTAGTTACGCAGGCAGTGCGTGT  
CCGCGCACCAACACACGGGGCTCATTCTCAGCGCGGC  
TGTTTTTTGTTCGAGACCACGGCTCACTGCAGCCTCGACCTCCCCGGGCTCACGCGATG  
CCTCACCTCAGGCTCCCAAGTAGTT

GTG: secuencia del primer fragmento RMRP-1: 383pb - GTT: secuencia del segundo fragmento RMRP-2: 347pb  
GTT: secuencia del tercer fragmento RMRP-3: 235pb - TGG: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

Tabla 3.13: Tipo y número de mutaciones descritas en la base de datos HGMD®, cebadores y condiciones de reacción de los exones amplificados para el gen *RMRP*

GEN <i>RMRP</i>						
TIPO Y NÚMERO DE MUTACIONES DESCRITAS	Número	CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 50µL				
		Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µL)	Temperatura	Tiempo
Mutaciones puntuales	64	Tampón Con MgCl <sub>2</sub>	10X+2mM	5	94°C	5 min
Pequeñas delecciones	2	dNTPs	1,25µM	8	95°C	30 s
Pequeñas inserciones	39	Cebadores F/R	10 pmol/µL	2/2	Th°C	30 s
Pequeñas inserciones+delecciones	2	GCRich (Roche)	5X	10	72°C	45 s
Complejas	1	ADN problema	50 ng/µL	2	72°C	10 min
		FastStar Taq polimerasa (Roche)	5 U/µL	0,5	4°C	∞
		Agua estéril (Braun)	---	20,5		

Fragmento	Tamaño	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Th°C
RMRP-1	383	5'GAAGCGGTCCGGCATTGGCCG3'	5'GAAAGGGGAGGAACAGAGTCC3'	62°C
RMRP-2	347	5CGTGTCTGAAGGCCTGTATCCT3'	5'CAACTACTTGGGAGCCTGAGG3'	62°C
RMRP-3	235	5'CTCAGCCCAACTTTC3'	5'TTGGCGGACTTTGGAGTG3'	59°C

Th: temperatura de hibridación

3.2.5.1.6. Gen *SHOX*:

Se diseñaron en nuestro propio laboratorio los cebadores para la amplificación de los exones codificantes del gen *SHOX* en 4 PCRs: exón 2, exón 3, exón 4-5 y exón 6A. El exón 1 no codifica. En las **figuras 3.14 a 3.17** se muestran los fragmentos amplificados y en la **tabla 3.15** las condiciones de trabajo y el número y tipo de

mutaciones que se pueden detectar con estos amplificadores. Las secuencias de referencia son NG\_009385.1, NM\_000451.3 y NP\_000442.1 que corresponden a la variante SHOX-202 de *Ensembl*.

Figura 3.14: Secuencia del exón 2 del gen SHOX

**CGCGGGGAGACGCGCGCATCCACCAGCCCCGGCTGCTCGCCAGCCCCGGCCCCAGCC**  
**1ATG GAA GAG CTC ACG GCT TTT GTA TCC AAG TCT TTT GAC CAG AAA AGC AAG**  
 1 Met Glu Glu Leu Thr Ala Phe Val Ser Lys Ser Phe Asp Gln Lys Ser Lys  
**GAC GGT AAC GGC GGA GGC GGA GGC GGC GGA GGT AAG AAG GAT TCC ATT ACG**  
 Asp Glu Asn Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys Asp Ser Ile Thr  
**TAC CGG GAA GTT TTG GAG AGC GGA CTG GCG CGC TCC CGG GAG CTG GGG ACG**  
 Tyr Arg Glu Val Leu Glu Ser Gly Leu Ala Arg Ser Arg Glu Leu Gly Thr  
**TCG GAT TCC AGC CTC CAG GAC ATC ACG GAG GGC GGC GGC CAC TGC CCG GTG**  
 Ser Asp Ser Ser Leu Gln Asp Ile Thr Glu Gly Gly Gly His Cys Pro Val  
**CAT TTG TTC AAG GAC CAC GTA GAC AAT GAC AAG GAG AAA CTG AAA GAA TTC**  
 His Leu Phe Tyr Asp His Val Asp Asn Asp Lys Glu Lys Leu Lys Glu Phe  
**GGC ACC GCG AGA GTG GCA GAAG** 277  
 Gly Thr Ala Arg Val Ala Glu 92  
**GTAAGTTCTTTGCGCTCCGGCTCCAGGGGGGCCCCCTCCTGGGGTTCCGGCGCC**

GTI: secuencia de cebadores - TGG: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

Figura 3.15: Secuencia del exón 3 del gen SHOX

**GCCACGTTGCGCAAAACCTC**CCCCGGCCTCAGCCCTGTGCCCTCCGCTCCCCACGCAG  
 278 **GG ATT TAT GAA TGC AAA GAG AAG CGC GAG GAC GTG AAG TCG GAG GAC GAG**  
 93 Gly Ile Tyr Glu Cys Lys Glu Lys Arg Glu Asp Val Lys Ser Glu Asp Glu  
 Asp  
**GAC GGG CAG ACC AAG CTG AAA CAG AGG CGC AGC CGC ACC AAC TTC ACG CTG**  
 Asp Gly Gln Thr Lys Leu Lys Gln Arg Arg Ser Arg Thr Asn Phe Thr Leu  
**GAG CAG CTG AAC GAG CTC GAG CGA CTC TTC GAC GAG ACC CAT TAC CCC GAC**  
 Glu Gln Leu Asn Glu Leu Glu Arg Leu Phe Asp Glu Thr His Tyr Phe Asp  
**GCC TTC ATG CGC GAG GAG CTC AGC CAG CGC CTG GGG CTC TCC GAG GCG CGC**  
 Ala Phe Met Arg Glu Glu Leu Ser Gln Arg Leu Gly Leu Ser Glu Ala Arg  
**GTG CAG** 486  
 Val Gln 162  
**GTAGGAACCCGGGGGCGGGGGCGGGGGCCCCGGAGCCATCGCCTGGTCTCCTCGGG**

GTI: secuencia de cebadores - TGG: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

Figura 3.16: Secuencias de los exones 4 y 5 del gen SHOX

**GGAGGCTGGGCTGGGT**CACAGGGCTCTTCACATCTCTCTGCTTCTCCCAAG  
 487 **GTT TGG TTC CAG AAC CGG AGA GCC AAG TGC CGC AAA CAA GAGA AT CAG**  
 163 Val Trp Phe Gln Asn Arg Arg Ala Lys Cys Arg Lys Gln Glu Asn Gln  
**ATG CAT AAA G** 544  
 Met His Lys 181  
 GTGGGTGTGCGGACTGGGGGACCTGAAGCTGGGGGATCCTGCTCCAGGAGGGATGGGGTC  
 GACGAGGTGCTGGCTACACCCAGGACCACCACTGACACCTGCTCCCTTTGGACACAG  
 545 **GC GTC ATC TTG GGC ACA GCC AAC CAC CTAGAC GCC TGC CGA GTG GCA CCC**  
 182 Gly Val Ile Leu Gly Thr Ala Asn His Leu Asp Ala Cys Arg Val Ala Pro  
**TAC GTC AAC ATG GGAGCC TTA CGG ATG CCT TTC CAA CAG** 633  
 Tyr Val Asn Met Gly Ala Leu Arg Met Pro Phe Gln Gln 211  
 GTAGCTCACTTTTCTTCTCTGAAGATCCCTAGGGACCTGCTGCTCCCTTCC

GTI: secuencia de cebadores - TGG: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante



Figura 3.17: Secuencia del exón 6A del gen SHOX

GTCCCCATCCTGCGCCCTCACCCCGCCGGGTCCGCTCCCGCAG

634 GTC CAG GCT CAG CTG CAG CTG GAA GGC GTG GCC CAC GCG CAC CCG CAC  
 212 Val Gln Ala Gln Leu Gln Leu Glu Gly Val Ala His Ala His Pro His  
 CTG CAC CCG CAC CTG GCG GCG CAC GCG CCC TAC CTG ATG TTC CCC CCG CCG  
 Leu His Pro His Leu Ala Ala His Ala Pro Tyr Leu Met Phe Pro Pro Pro  
 CCC TTC GGG CTG CCC ATC GCG TCG CTG GCC GAG TCC GCC TCG GCC GCC GCC  
 Pro Phe Gly Leu Pro Ile Ala Ser Leu Ala Glu Ser Ala Ser Ala Ala Ala  
 GTG GTC GCC GCC GCC GCC AAA AGC AAC AGC AAG AAT TCC AGC ATC GCC GAC  
 Val Val Ala Ala Ala Ala Lys Ser Asn Ser Lys Asn Ser Ser Ile Ala Asp  
 CTG CCG CTC AAG GCG CGG AAG CAC GCG GAG GCC CTG GGG CTC TGA 879  
 Leu Arg Leu Lys Ala Arg Lys His Ala Glu Ala Leu Gly Leu \* 293  
 CCC GCC GCG CAG CCC CCC GCG CGC CCGACTCCCGGGCTCCGCG

GTI: secuencia de cebadores - TCG: región codificante (exón) - C: mutaciones descritas - GTG: secuencia no codificante

Tabla 3.15: Tipo y número de mutaciones descritas en la base de datos HGMD®, cebadores y condiciones de reacción de los exones amplificados para el gen SHOX

GEN SHOX						
TIPO Y NÚMERO DE MUTACIONES DESCRITAS		CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 50µL				
	Número	Reactivo	Concentración inicial	Volumen (µL)	Temperatura	Tiempo
Mutaciones puntuales	90	Tampón Con MgCl <sub>2</sub>	10X+2mM	5	94°C	5 min
Splicing	4	dNTPs	1,25µM	8	95°C	40 s
Pequeñas deleciones	17	Cebadores F/R	10 pmol/µL	2/2	Th°C	90 s
Pequeñas inserciones	7	GCRich (Roche)	5X	10	72°C	10 min
Pequeñas inserciones+deleciones	2	ADN problema	50 ng/µL	2	4°C	∞
		FastStar Taq polimerasa (Roche)	5 U/µL	0,5		
		Agua estéril (Braun)	---	20,5		

Fragmento	Tamaño	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Th°C
Exón 2	386	5'CGCGGGGAGACGCGCATCC3'	5'GGCGCGGAACCCAGGACGACGGC3'	68°C
Exón 3	320	5'GCCACGTTGCGCAAACTC3'	5'GGCGCGGACCCGAGGACGAGGCGATG3'	62°C
Exón 4-5	375	5'GGGAGGCTGGCTGTTCC3'	5'GGAAGGGAGCAGCAGGTCC3'	63°C
Exón 6	333	5'GTCCCCATCCGCCCTCACCC3'	5'GCGCGGAGCCCGGGAGTCCG3'	68°C

Th: temperatura de hibridación

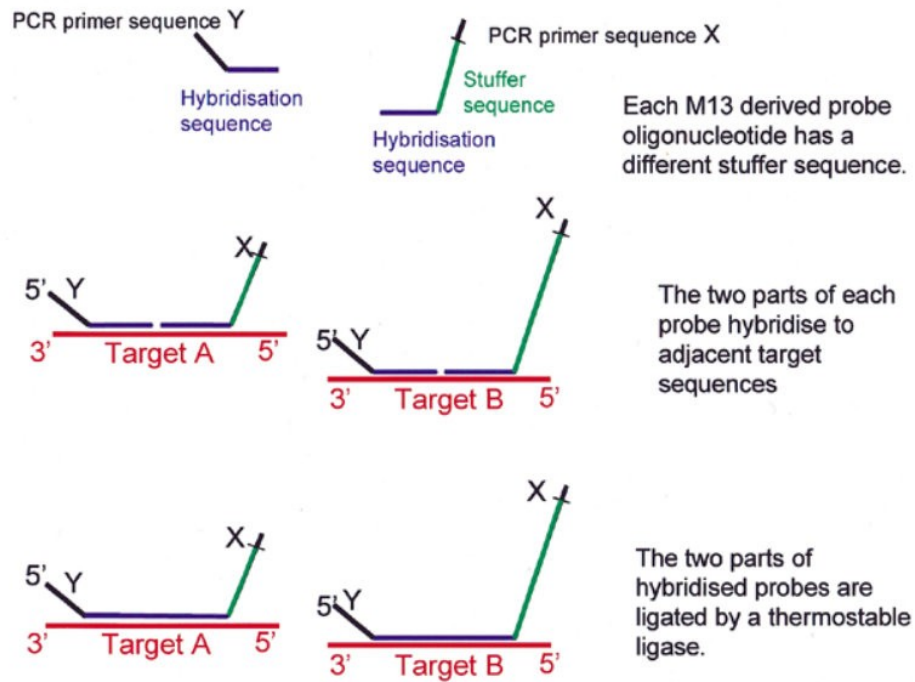
### 3.2.5.2. MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

La técnica de amplificación multiplex de sondas dependientes de ligación (MLPA) fue descrita en 2002 por Schouten y colaboradores. Permite la detección de grandes deleciones y/o duplicaciones en un único gen o varios. La técnica consiste en una sondas con las secuencias a estudio que, por pares, hibridan con el ADN genómico. Pasan por un proceso de ligación seguido de una PCR que amplifica una secuencia específica del fabricante (**figura 3.18**). Las sondas están agrupadas en SALSAs comerciales fabricadas por MRC-Holland.

Figura 3.18: Técnica de MLPA (Schouten, 2002)

## MLPA, Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

- Denatured genomic DNA is hybridized with a mixture of 40 probes.
- Each MLPA probe consists of two oligonucleotides, one synthetic and one M13-derived.



All probe ligation products are amplified by PCR using only one primer pair.



Amplification products are separated by electrophoresis. Relative amounts of probe amplification products reflect the relative copy number of target sequences.

El protocolo inicial hasta 2010 incluía los siguientes pasos:

1. Desnaturalización de ADN genómico: se diluyó 1,5 µL de ADN problema con 3,5 µL de agua estéril (*Braun*) en un tubo Eppendorf de 0,2 mL. Se desnaturalizó en un termociclador 2720 Thermal Cycler (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) durante 10 minutos a 98°C.
2. Hibridación de sondas comerciales: con el termociclador a 25°C se añadió a cada tubo 1,5 µL de sonda comercial más 1,5 µL de buffer. Se desnaturalizó

esta mezcla durante 1 min a 95°C y se hibridó durante un mínimo de 16 h a 60°C.

3. Ligación: con el termociclador a 54°C se añadió a cada pocillo 32 µL de una mezcla formada por 3 µL de Ligasa-Buffer A más 3 µL de Ligasa-Buffer B más 25 µL de agua estéril (*Braun*) y 1 µL de enzima Ligasa. Se mantuvo 15 minutos a 54°C y luego 5 min a 98°C para inactivar la ligasa. Para estabilizar los productos obtenidos se mantuvieron las muestras a 4°C durante 20 min.
4. PCR: manteniendo las muestras a 4°C, se prepara en otro tubo de 0,2 mL una mezcla formada por 2 µL de SALSA PCR-Primers más 2 µL de *Dilution-Buffer* más 4 µL de buffer más 31,5 µL de agua estéril (*Braun*) y 0,5 µL de enzima Polimerasa la cual se le añaden 10 µL de las muestras mantenida a 4°C. Se realizó la PCR en el termociclador 2720 Thermal Cycler (*Applied Biosystem, Foster City, CA, USA*) con las condiciones siguientes: 1 min a 96°C seguido de 35 ciclos de 95°C durante 45s; 60°C 45s y 72°C 1 min; con un paso final de 20 min a 72°C.

A 1,5 µL de este producto final se le añadieron 8 µL de formamida ultra pura (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) y 0,5 µL de marcador de peso molecular Gene Scan 500 LIZ Standard (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). De esta forma, las muestras ya estaban preparadas para su análisis por electroforesis capilar en el ABPRISM® 3130xl Genetic Analyser (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

En cada ensayo se introdujo un control negativo, otro positivo y una muestra de agua para validar el ensayo. Los electroferogramas resultantes fueron comparados con el control negativo una vez que éste hubiese sido validado por el control positivo. Para ello se compararon las áreas normalizadas de cada sonda con las correspondientes del control negativo. Una variación en más del 35% tanto en positivo como en negativo se consideró patológico, de modo que la disminución se consideró delección y el aumento, duplicación, en heterocigosidad en ambos casos. Para la normalización se utilizó una hoja de cálculo Excel.

A partir de 2010 la casa comercial introdujo unas variaciones en el procedimiento que simplificaban el ensayo y unos reactivos que estabilizaban más los productos obtenidos y permitían una mejor reproducibilidad. Era imprescindible partir de una muestra de ADN con baja concentración de sales y con una concentración de 50-100 ng/ µL. Las variaciones introducidas fueron:

1. Desnaturalización de ADN genómico: se parte de 5 µL de ADN problema directos en un tubo Eppendorf de 0,2 mL. El resto igual.
2. Hibridación de sondas comerciales: no se modificó.
3. Ligación: no se modificó la ligación pero sí se suprimió la estabilización a 4°C.

4. PCR: manteniendo las muestras a Tª ambiente (25°C), se añadió a cada tubo una mezcla de 2 µL Master Mix más 7,5 µL de agua estéril (*Braun*) más 0,5 µL de enzima Polimerasa. Las condiciones del termociclador eran las mismas.

El estudio mediante MLPA se realizó para el gen *SHOX*. La SALSA utilizada fue la P018 y las versiones: D1, E1 y F1. El cambio de versiones se ha ido realizando según las distintas investigaciones que han ido demostrado la ineficiencia del estudio de determinadas regiones y la necesidad de aumentar la sensibilidad en el análisis de otras.

La diferencia principal entre la versión D1 y E1, a parte del cambio en sondas para secuencias controles fuera del cromosoma X, es que las sondas para la región 3' del PAR1 del gen *SHOX* es más extensa y las secuencias son más estables y presentan menos SNPs conocidos. La región 5' así como las sondas para todos los exones del gen *SHOX* no se modificaron. La región 3' del PAR1 pasa de 15 sondas a 17 y se modificaron 4 sondas que daban falsos positivos (**tabla 3.16**).

**Tabla 3.16: SALSA P018-E1. Con fondo verde se señalan las sondas introducidas en esta versión con respecto a la D1**

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene / exon	Ligation site NM_000451.3	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<b>P-telomere / start PAR1 region</b>			227 kb
211 ~	09333-L10292	PPP2R3B gene		CGTCCGAGTTC-ACTCGCGCTACA	273.0 kb
265	01341-L06221	<b>SHOX region LOC159015</b>	4.7 kb before start SHOX gene	GCCTGGAACAGA-ACCTCCGCGGGG	4.7 kb
		<i>SHOX startcodon</i>	692-694		
166	01145-L00702	<b>SHOX</b> exon 1	99-100	TTTCTACTGCAA-ACAGAAATGGGA	6.7 kb
204	01146-L06220	<b>SHOX</b> exon 2	920-921	ACCACGTAGACA-ATGACAAGGAGA	3.6 kb
245	01147-L00802	<b>SHOX</b> exon 3	1032-1034	CGGGCAGACCAA-GCTGAAACAGAG	6.2 kb
300	01148-L15501	<b>SHOX</b> exon 4	1198-1199	CAGAACCGGAGA-GCCAAGTGCCGC	0.2 kb
335	01149-L00910	<b>SHOX</b> exon 5	1261-1262	ACAGCCAACCAC-CTAGACGCTGC	3.5 kb
231	09337-L00911	<b>SHOX</b> exon 6 (6a)	1506-1507	AAGCAACAGCAA-GAATTCAGCAT	6.4 kb
		<i>SHOX stopcodon</i>	1568-1570		
226	09336-L00708	<b>SHOX</b> intron 6	6.4 kb after exon 6	TGGCTTCAGAG-TTCAGCCATTG	6.4 kb
392	09338-L15503	<b>SHOX</b> exon 7 (7b)	1.4 kb before exon 7 (only present in NM_006883.2)	TCCACATTCTT-GGAATCACAATG	56.8 kb
136	05642-L05096	Xp22.32-PAR1		GCAGCAGTGAAA-GTGAGCATTCCC	19.8 kb
154	13821-L14642	Xp22.32-PAR1		GATGGCTGATAA-TTACTCCGTATG	11.4 kb
172 ±	05643-L15705	Xp22.32-PAR1		ACACCACAGAGT-TACTTGAATCAA	45.4 kb
198	13296-L15336	Xp22.32-PAR1		GGAAAACCACGT-TCCTATCGATCC	57.7 kb
318 §	05645-L05099	Xp22.32-PAR1		TGTTCCACCGT-AAAACTCACTCC	8.5 kb
432 §	05646-L15507	Xp22.32-PAR1		TGCATGTCTGCT-TTTTGAATGGCC	10.7 kb
463 §	13297-L15510	Xp22.32-PAR1		TACAGCAAATGA-TACGTATAAATT	6.3 kb
290 §	06291-L06222	Xp22.32-PAR1		CTTGAAAGGCA-GGAACCTAATT	0.4 kb
184 §	06293-L06219	Xp22.32-PAR1		TAATTGATGAGA-TGCAGAAGCCAG	15.4 kb
148	05648-L06218	Xp22.32-PAR1		TGGTGCTGAAAT-GAGGAAGCCCTG	48.7 kb
178	05649-L15335	Xp22.32-PAR1		TGAGGAGGTACC-TCAAAGCTAAAC	64.4 kb
439	09335-L15508	Xp22.32-PAR1		GAAATTCAGTTT-TAATAACACAGA	66.0 kb
370	14697-L16348	Xp22.32-PAR1		CTCTGGTGAGAT-GCCATCTAGAGA	338.0 kb
400	13911-L16505	CRLF2 gene		GAATGCCAGCAA-ATACTCCAGGAC	73.9 kb
386	10251-L15502	CSF2RA gene		GACAAGCCTTCT-GCTCTGTGAGTT	69.8 kb
142	13597-L15055	IL3RA gene		TGCACAGATAAG-TTGTGCTCTTT	280.7 kb
310 ~	01153-L00712	ASMT gene		GACATCCAGAA-GTGGTGTGGACG	4443.7 kb
		<b>End of PAR1 region</b>			
283 +	05587-L04577	NLGN4X gene	Xp22.32	GACGGCTGGGT-GATGCACGAAT	2311.9 kb
238 +	06402-L09795	KAL1 gene	Xp22.31	GTTTCTGAAGC-GTGTGCCACAA	1208.9 kb
328 +	02566-L10170	GPR143 gene	Xp22.2	GGGCGCTGGAGT-CCCAACTTACCT	5095.4 kb
274 +	03906-L03066	FANCB gene	Xp22.2	TCTCATCAGAA-TCTCCCTATAAA	114321.4 kb
420 +	00820-L15506	AIFM1 gene	Xq25	TATTGGTCTGT-GGACAGTAGTTT	25732.3 kb
		<b>Start of PAR2 region</b>			
355 ~±	01156-L00659	VAMP7 gene (PAR2)	Xq28	TGTGGGAAAAGT-GTTTCCATTCTG	Very close to q-telomere

Con respecto a la versión P018-F1, no se modifican el gen *SHOX* y en el PAR1 de la región 3' sólo se añade una sonda más en la región más alejada del gen.

### 3.2.5.3. Minisecuenciación

La técnica de minisecuenciación es utilizada para la detección de mutaciones en el ADN fetal circulante en el plasma materno. Para ello es necesario que esa mutación no se encuentre en el ADN materno pues sería indistinguible. Del mismo modo, la mutación tiene que ser conocida y estudiada previamente al embarazo. Hoy en día se puede realizar esta técnica entre la semana 8 y la 14 de modo que permite conocer la presencia o ausencia de la mutación en el feto y con esta información planificar la realización o no de una prueba de diagnóstico invasivo fetal. El desarrollo de esta técnica, así como el diseño para estas y otras enfermedades, lo está realizando D<sup>a</sup> Sara Perlado Marina, en la Sección de Citogenética del Servicio de Genética Clínica de la FJD con el título «Abordaje de nuevos diagnósticos genéticos fetales en sangre materna» bajo la dirección de la Dra. Marta Rodríguez de Alba y la Dra. Ana Bustamante.

Como el ADN fetal está muy fragmentado en el plasma materno, la técnica consiste en una primera PCR de amplificación de la región problema con un tamaño relativamente pequeño (<200 pb). Posteriormente se realiza una segunda PCR de secuenciación donde uno de los reactivos utilizados tiene los dos nucleótidos implicados en la mutación (el silvestre y el mutado) con dos fluorocromos distintos. Cuando estos productos son sometidos a electroforesis capilar aparecerá un único pico con el fluorocromo no patológico, si no existe la mutación, o dos picos de dos fluorocromos distintos correspondientes a la mutación y al silvestre.

Esta técnica se utilizó para la detección de la mutación p.Gly380Arg del gen *FGFR3* en tres embarazos en curso de tres casos entre las semanas 23 y 35 de gestación. En los tres casos se utilizó una técnica complementaria para verificar los resultados obtenidos en el ADN fetal.

Del mismo modo se utilizó para detectar la mutación g.236G>A paterna del gen *RMRP* en dos embarazos consecutivos de la familia ACH-128 en la semana 11 de gestación. Los resultados de esta técnica fueron comprobadas mediante una técnica de diagnóstico invasivo fetal.

### 3.2.5.4. PCR a tiempo real y análisis por alta resolución de fusión (*High Resolution Melting*)

Estas dos técnicas fueron realizadas por un grupo del Servicio que utiliza estas técnicas de forma rutinaria para el diagnóstico molecular de otras enfermedades no óseas. Al no haber realizado la técnica la tesinando, se explica someramente cada una de ellas.

La PCR a tiempo real es una PCR que permite, a la vez que amplifica, cuantificar



el producto amplificado. En nuestro caso se amplificó el exón 3 del gen *SLC26A2* con el reactivo SYBR Green I Master Mix (*Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany*) en un termociclador Light Cycler 480 (*Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany*) que presenta unos sensores para medir la fluorescencia. Los amplicones resultantes se analizaron mediante la técnica de alta resolución de fusión, basada en la comparación de las curvas (de fusión) resultantes de la distintas temperaturas de desnaturalización ( $T^{\circ}$  de *melting*) que a su vez dependen de los nucleótidos que constituyen los distintos amplicones. Esta técnica permite detectar diferencias, incluso el cambio en un único nucleótido.

### 3.2.6. Técnicas moleculares: análisis indirectos

#### 3.2.6.1. Microsatélites

Se diseñó una PCR multiplex que permitió la amplificación de varios microsatélites a la vez por la combinación de sus tamaños de amplificado y los fluorocromos utilizados. Las condiciones de reacción fueron las mismas para todos ellos y quedan reflejadas en la **tabla 3.17**.

**Tabla 3.17: Condiciones de reacción de los microsatélites utilizados**

CONDICIONES DE PCR CON VOLUMEN FINAL 20ML				
Reactivo	Concentración inicial	Volumen ( $\mu$ L)	Temperatura	Tiempo
Tampón Con $MgCl_2$	10X+2mM	2	94°C	5 min
dNTPs	1,25 $\mu$ M	3,2	55°C	1 min
Cebadores F/R	10 pmol/ $\mu$ L	1+1 para cada marcador	72°C	1 min
ADN problema	50 ng/ $\mu$ L	2	94°C	45 s
FastStar Taq polimerasa (Roche)	5 U/ $\mu$ L	0,2	55°C	40 s
Agua estéril (Braun)	---	12,6-2 x cada marcador	72°C	5 min
			4°C	$\infty$

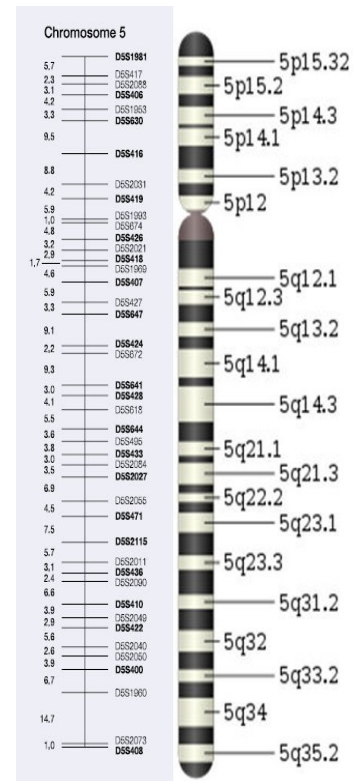
##### 3.2.6.1.1. Gen *SLC26A2*

Los microsatélites utilizados fueron los disponibles en los paneles de *Linkage Mapping Sets version 2.5* (*Applied Biosystems*). En la **tabla 3.18** se muestra los marcadores con el tamaño del amplificado y el fluorocromo empleado. Al ser unos marcadores comerciales las secuencias de los cebadores no son accesibles. En la **figura 3.19** se muestra la localización de los marcadores a lo largo del cromosoma 5.

**Tabla 3.18: Microsatélites utilizados para el cromosoma 5**

	Tamaño	Fluorocromo
D5S1981	115-125	NED
D5S406	164-192	NED
D5S630	283-293	VIC
D5S419	255-287	VIC
D5S426	275-299	VIC
<i>Centrómero</i>		
D5S418	208-228	VIC
D5S407	82-110	FAM
D5S647	326-365	NED
D5S424	212-234	VIC
D5S641	299-339	NED
D5S428	241-259	VIC
D5S644	82-112	VIC
D5S433	63-93	NED
D5S2027	180-202	FAM
D5S471	235-255	NED
D5S2115	142-170	VIC
D5S436	238-258	FAM
D5S410	329-351	FAM
D5S422	113-135	NED
D5S400	217-239	NED
D5S408	249-285	FAM

**Figura 3.19: Localización de los microsatélites a lo largo del cromosoma 5**



### 3.2.6.1.2. Gen *SHOX*:

Los microsatélites utilizados fueron los descritos por Benito-Sanz y colaboradores (Benito-Sanz, 2005) para DXYS10092, DXYS10093, DXYS10083 y DXYS10096; y los marcadores DXS6796, DXYS233 y DXS6814 de la base de datos *Geneloc*. En la **tabla 3.19** se muestra los marcadores, sus secuencias así como otras características.

**Tabla 3.19: Microsatélites utilizados para el gen *SHOX***

<i>Xpter</i>	Distancia	Motivo	Heterogeneidad	Tamaño	Fluorocromo	Secuencia de oligonucleótidos
DXYS10092	550 kb	GA	0,96	317-367	NED	F: 5'-TTC GTG ACA AAG GCC TTT GC-3' R: 5'-CTA CAA GTC CTA GTA CCT AC3
DXYS10093	586 kb	CT	0,69	233-259	FAM	F: 5'-GCC CGT GAT CCC AGT ACT G3' R: 5'-CAA CTT CCT TGG AAA TCT TC3'
DXYS10083	651 kb	TG	0,82	150-172	FAM	F: 5'-GGGGGTGTTTGGAATGGTATAAT3' R: 5'-TTACAATGTATGTCAGCAGAGACC3'
DXS6796	878 kb	DND	DND	252	FAM	F: 5'-TGATTCTGCCACAGTAATACG3' R: 5'-CACGTTCTGGCACATGTATC3'
DXYS10096	795 kb	TG	0,5	240-252	VIC	F: 5'-TTT AAC AAA CCG CAT TCT CCA A3' R: 5'-GTG GTG GAG CTT GCA GTG A3'
DXYS233	868 kb	dinuc	DND	271-288	FAM	F: 5'-TGGAATTTCGAGGCTG3' R: 5'-TGATTTCATCCTGGGGT3'
DXS684	1400 Mb	tetra	DND	158-178	NED	F: 5'-TTTCCAGAAGCTCAGATCC3' R: 5'-TATCCATCCATCCATCAACC3'

*Centrómero*

### 3.2.7. Estadística

Se realizó un estudio estadístico para la edad paterna avanzada y su relación con mutaciones en el gen *FGFR3*. Para ello se aplicó el test de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad y el test de Levene para la homocedasticidad en la distribución de datos. Se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA) asumiendo la edad como variable dependiente. Para el estudio estadístico se dividieron las muestras en dos grupos: el grupo 1 eran los padres que habían tenido un feto afecto de displasia ósea por mutaciones en el gen *FGFR3* y el grupo 2 los que habían tenido un feto afecto de displasia ósea pero no debido a mutaciones en el gen *FGFR3*.

### 3.2.8. Herramientas bioinformáticas

EMQN: <http://www.emqn.org>

Ensembl Genome Browser: <http://ensembl.org>

Functional analysis through Hidden Markov Models (v2.3):  
[www.fathmm.biocompute.org.uk/index.html](http://www.fathmm.biocompute.org.uk/index.html)

GeneLoc: [http://genecards.weizmann.ac.il/geneloc\\_ncbi36/index.shtml](http://genecards.weizmann.ac.il/geneloc_ncbi36/index.shtml)

GeneReviews: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>

Human Genome Variation Society (HGVS): <http://www.hgvs.org/>

KinMut2: <http://www.kinmut2.bioinfo.cnio.es/KinMut2>

The Human Gene Mutation Database (HGMD):

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

MRC-Holland: <http://www.mlpa.com>

Mutalyzer: <https://mutalyzer.nl/>

MutationAssesor: <http://mutationassessor.org>

Mutation Taster: <http://www.mutationtaster.org>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Orphanet: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>

PCR insilico: [http://insilico.ehu.es/user\\_seqs/](http://insilico.ehu.es/user_seqs/)

Polyphen-2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

PROVEAN/SIFT: <http://www.provean.jcvi.org/index.php>

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

SHOX home: <http://hyg-serv-0,1.hyg.uni-heidelberg.de/lovd/index.php?>



[select\\_db=SHOX](#)

UniSTS convertido a Prove: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/>

UPD: <http://upd-tl.com/upd.html>

Wikipedia: <http://es.wikipedia.org/>



## **4. resultados**

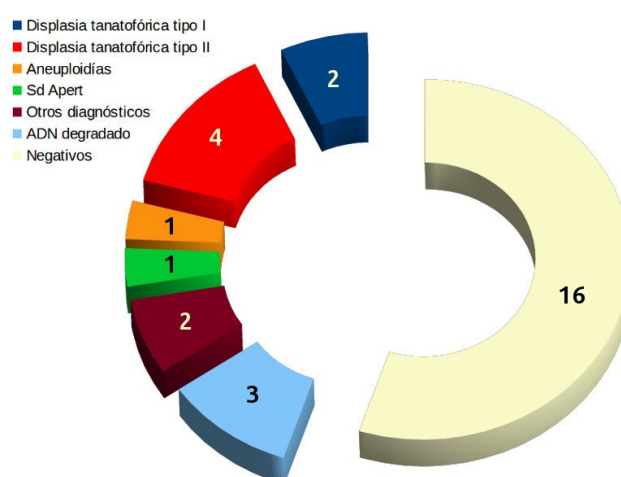


## 4. Resultados

### 4.1. RESTOS ABORTIVOS

De las 29 muestras recogidas, se obtuvo un diagnóstico final en 10 de ellas (34,5%, **figura 4.1, tabla 4.1**). En 3 no se pudo obtener resultado porque el ADN estaba degradado ya que provenía de un tejido fetal muy estropeado que tampoco progresó en cultivo (10,3%). En 16 casos no se obtuvo diagnóstico confirmatorio (55,2%). En el periodo 1998 al 2006 hay 19 casos y en el segundo 10 casos.

**Figura 4.1. Resultado obtenido de las 29 muestras de restos abortivos recogidas**



Los 10 diagnósticos positivos fueron:

- Gen *FGFR3*: 6 casos, todos displasias tanatofóricas, 2 correspondientes al tipo I y 4 al tipo II. En el periodo comprendido entre 1998 y 2006 se detectaron 1 DT-I y 3 DT-II. A partir del año 2007 se obtuvo 1 DT-I y otra DT-II. En la **figura 4.2** se muestran las radiografías realizadas a varios casos entre los que hay 2 positivos: ACH-82 afecto de DT-I y el ACH-93 afecto de DT-II.
- Gen *FGFR2*: el caso ACH-71, tras necropsia del aborto y ante la presencia de sindactilia en manos y pies, se sospecha un síndrome de Apert. Presentaba la mutación en heterocigosis *de novo* p.Pro253Arg [c.758C>G] (Wilkie, 1995) descrita como patogénica en numerosas ocasiones (**figura 4.2**).
- Otros:
  - Aneuploidía : triploidía (ACH-107) (**figura 4.2**)

- 2 displasias óseas por mutaciones en otros genes distintos a *FGFR3*: ACH-121, un aborto afecto de osteogénesis imperfecta tipo 2, y el caso ACH-207, afecto de síndrome de Ellis van Creveld ( *figura 4.2*).

Tabla 4.1. Resultados de las 29 muestras de restos abortivos recogidas

FAMILIA	INDICACIÓN CLÍNICA	SEMANAS DE GESTACIÓN	CARIOTIPO*	RESULTADO	ALTERACIÓN ENCONTRADA	EDAD PADRE
ACH 4	DO	16	46,XY	<b>Displasia tanatofórica tipo II</b>	<i>FGFR3</i> : p.Lys650Glu	43
ACH 11	DO	17	46,XY	Negativo	--	35
ACH 12	DO	20	masculino	Negativo	--	DND
ACH 17	DO	22	DND	Negativo	--	DND
ACH 22	DO	20	DND	Negativo	--	DND
ACH 33	DO	19	XX, 13, 18, 21 NORMAL	Negativo	--	DND
ACH 35	DO	23	46,XY	Negativo	--	DND
ACH 37	DO	12	46,XY	Negativo	--	DND
ACH 56	DO	22	DND	ADN degradado	--	DND
ACH 57	ACH	23	DND	ADN degradado: compatible +18	--	45
ACH 58	DO	21	DND	ADN degradado	--	DND
ACH 61	DT	37	masculino	Negativo	--	DND
ACH 67	DO	18	XY, 13, 18, 21 NORMAL	Negativo	--	DND
ACH 69	ACH	20	femenino	<b>Displasia tanatofórica tipo II</b>	<i>FGFR3</i> : p.Lys650Glu	DND
ACH 71	Apert	22	DND	<b>Síndrome de Apert</b>	<i>FGFR2</i> : p.Pro253Arg	DND
ACH 82	DO	23	XY, 13, 18, 21 NORMAL	<b>Displasia tanatofórica tipo I</b>	<i>FGFR3</i> : p.Arg248Cys	DND
ACH 85	DO	21	XX, 13, 18, 21 NORMAL	Negativo	<b><i>FGFR3</i>: p.Phe384Leu</b>	33
ACH 86	DO	22	XY, 13, 18, 21 NORMAL	Negativo	--	DND
ACH 93	DO	22	masculino	<b>Displasia tanatofórica tipo II</b>	<i>FGFR3</i> : p.Lys650Glu	39
ACH 104	DT	19	46,XX	Negativo	--	42
ACH 107	DO	21	<b>69,XXY</b>	<b>Aneuploidia</b>	69,XXY	33
ACH 111	DO	19	46,XX	<b>Displasia tanatofórica tipo I</b>	<i>FGFR3</i> : p.Arg248Cys	33
ACH 121	DO	22	46,XY	<b>Osteogénesis imperfecta tipo 2</b>	<i>COL1A1</i> : p.Gly857Ser	35
ACH 122	DT	17	46,XX	<b>Displasia tanatofórica tipo II</b>	<i>FGFR3</i> : p.Lys650Glu	34
ACH 161	DO	22	XX, 13, 18, 21 NORMAL	Negativo	--	DND
ACH 207	ACH	21	femenino	<b>Ellis van Creveld</b>	<i>EVC2</i> : p.Trp215*mat;p.Arg677*pat	DND
ACH 243	DO	22	masculino	Negativo	--	DND
ACH 288	DO	28	46,XY	Negativo	--	DND
ACH 297	ACH, cardiopatía	22	masculino	Negativo	--	DND

El sexo se obtuvo por cariotipo, FISH, QF-PCR, observación de genitales o dato aportado por el lugar de remite.  
ACH: acondroplasia; DND: dato no disponible; DO: displasia ósea; DT: displasia tanatofórica.

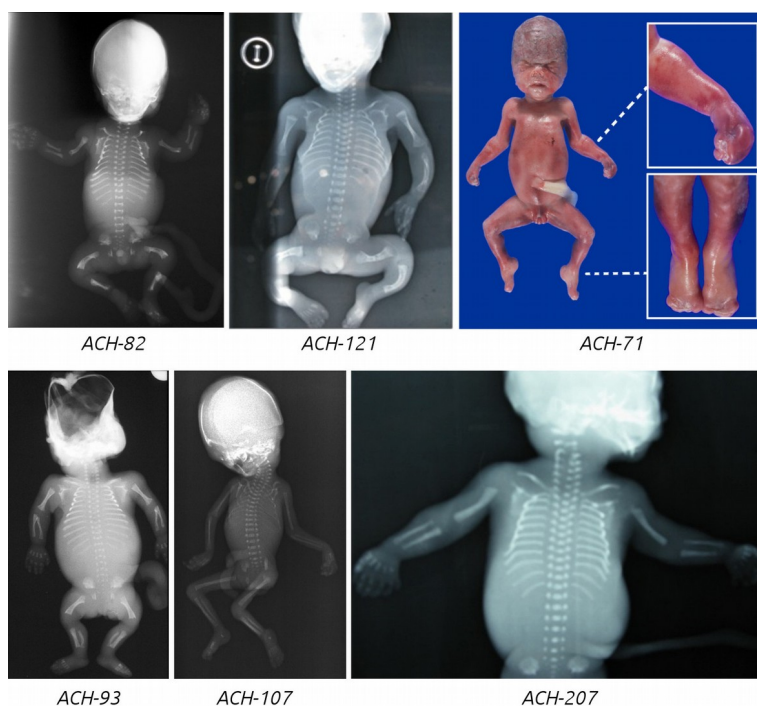
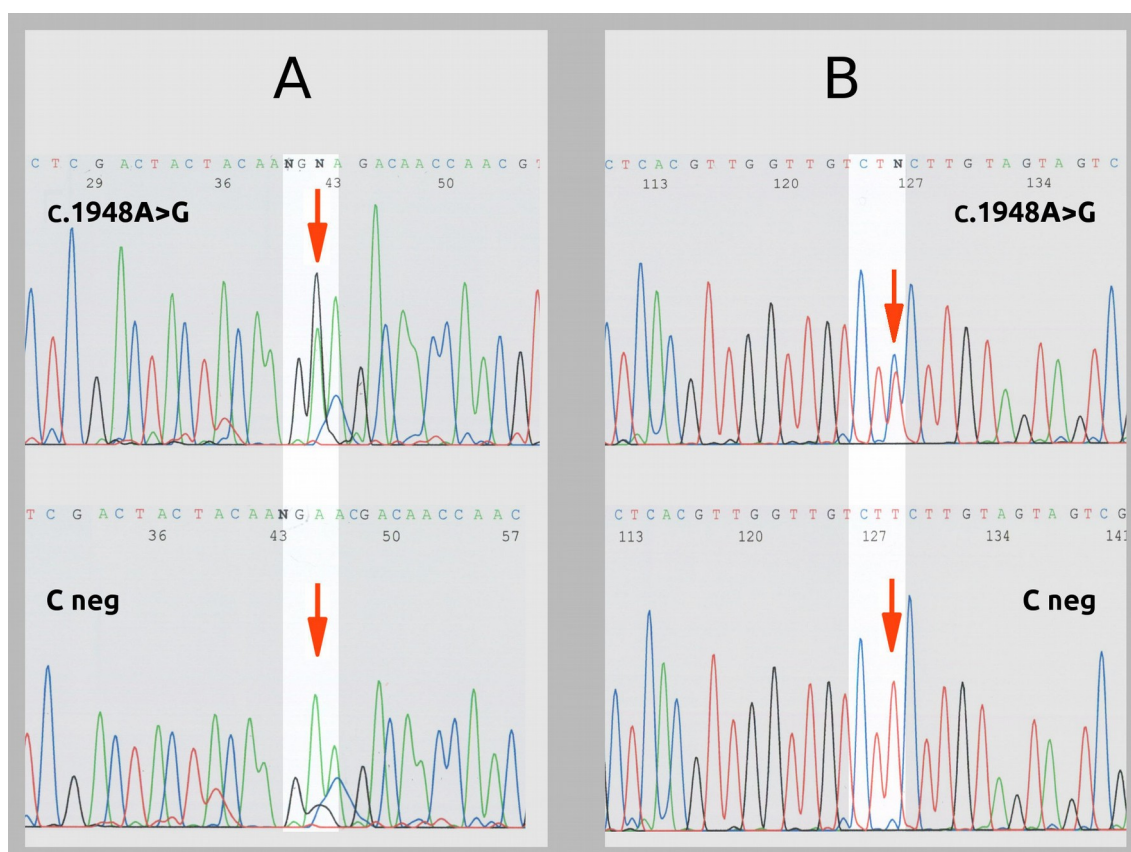


Figura 4.2: Casos recibidos en los que se pudo realizar la toma fotográfica y radiológica

### 4.1.1. Resultados positivos para el gen *FGFR3*

Los 6 casos con alteración en el gen *FGFR3* presentan la mutación más frecuente para cada tipo descritas por Tavormina en 1994 para TD-I [c.742C>T; p.Arg248Cys] y en 1995 para TD-II [c.1948A>G; p.Lys650Glu] (**figura 4.3**).

**Figura 4.3.** Mutación c.1948A>G; p.Lys650Glu en un sentido (A) y en el sentido contrario (B) frente a control negativo



El caso ACH-85 resultó negativo pero en él se encontró la variante c.1150T>C; p.Phe384Leu.

Las semanas de gestación en las que se detectaron las anomalías esqueléticas ecográficamente fueron entre las semanas 16 y 23, en 26 de los 29 casos. Los otros 3 casos se detectaron 1 de forma muy precoz, a las 12 semanas de gestación (ACH-37,) y 2 de forma tardía a las 28 (ACH-288) y 37 (ACH-61) semanas de gestación.

En 5 de los 6 casos positivos para mutaciones en el gen *FGFR3* se aportó clínica: 3 casos de los 5 presentaban micromelia, 4 fémur corto recto o curvo, 2 hidrocefalia y 2 alteraciones en tórax de carácter letal. Es decir, en los 5 casos se detectó una alteración en miembros inferiores pero sólo 2 reflejan hipoplasia de tórax. De los 4 casos de DT-II tenemos descripción clínica en 3 y en los 3 se

destaca una alteración craneal: 1 con el característico cráneo en trébol y 2 con hidrocefalia.

En 4 de los 6 casos solicitaban estudio de displasia ósea general, en otro estudio de acondroplasia al no detectar alteraciones torácicas y en otro de displasia tanatofórica al detectar tórax estrecho.

#### **4.1.2. Resultados negativos para el gen *FGFR3***

Entre los 16 casos con estudio negativo tenemos:

- 4 casos sin explicación de la clínica fetal observada en la ecografía aunque uno de ellos indicaba ACH con cardiopatía, signo clínico que no es característico de la ACH.
- 12 casos que aportaban la clínica presentada por el feto:
  - En 7 casos la indicación reflejada fue de DO por micromelia.
  - En 3 casos se solicitó estudio de DO pero la clínica reflejada no era característica de mutaciones en *FGFR3*:
    - ACH-11: 5 abortos anteriores
    - ACH-22: hipoplasia torácica recidivante
    - ACH-85: oligoamnios
  - En los 2 casos restantes, la clínica era de, en un caso, enanismo letal, que es la forma común de indicar displasia tanatófora, y en el otro, aborto con una clínica muy sugerente de displasia tanatofórica: feto con CIR severo, cráneo en trébol, hipoplasia torácica y rizomelia (ACH-61).

Sólo tenemos constancia de la necropsia en 5 casos: ACH-57, ACH-161, ACH-243, ACH-288 y ACH-297. El caso ACH-57 es 1 de los 3 casos en los que no se pudo realizar ningún estudio, sin embargo la necropsia indicaba la compatibilidad con trisomía 18 o Síndrome de Edward. Este diagnóstico no pudo comprobarse. El facultativo tenía la sospecha de ACH pero no indicó clínica sugerente de ninguna de las dos patologías.

De los 4 casos restantes con necropsia, englobados entre los 16 casos con resultado negativo, a pesar de que en todos ellos el diagnóstico fue de DO y que en 3 se visualizaba micromelia como alteración mayor (la familia ACH-297 no aportaba clínica), la necropsia fue de ausencia de morfología característica de osteocondrodисplasia.



## 4.2. ESTUDIOS PRENATALES

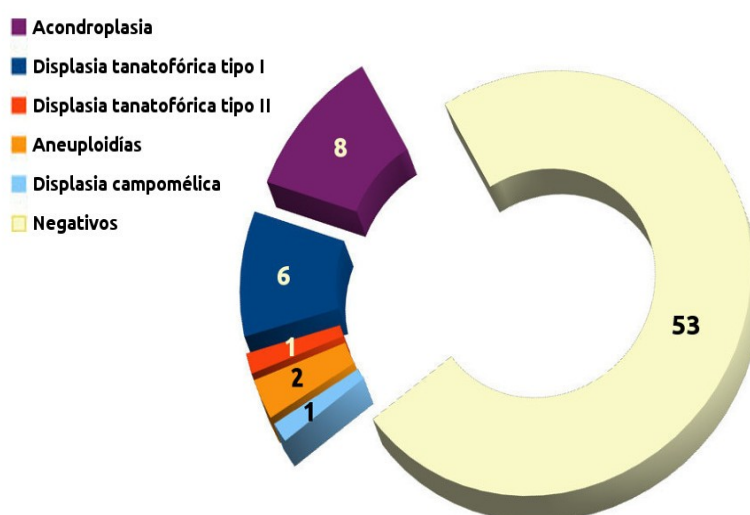
De las 74 muestras recibidas 19 casos tuvieron un diagnóstico molecular positivo (25,7%), 1 muestra no se pudo procesar por ADN degradado (1,4%) y 54 muestras fueron negativas (72,9%). De estas 74 muestras, 71 eran para estudio de mutaciones en el gen *FGFR3*. Las tres que faltan fueron: el estudio del gen *SHOX* en la familia ACH-152 tras el cariotipo fetal encontrado y dos muestras de dos gestaciones consecutivas para la misma familia ACH-128 tras el diagnóstico molecular confirmatorio de un hijo afecto de hipoplasia de pelo-cartílago (gen *RMRP*).

### 4.2.1. Gen *FGFR3*

En 71 casos se solicitó el estudio del gen *FGFR3*. Dieciocho de ellas tuvieron un resultado positivo repartidos en las siguientes patologías (**figura 4.4**):

- 8 casos afectados de ACH
- 6 casos afectados de displasia tanatofórica tipo I
- 1 caso de afecto de displasia tanatofórica tipo II
- 3 casos con otro resultado:
  - 2 aneuploidías
  - 1 displasia campomélica

**Figura 4.4. Resultado de las 71 muestras de diagnóstico prenatal para el gen *FGFR3***



A continuación se muestran los resultados en función de las 3 categorías propuestas.

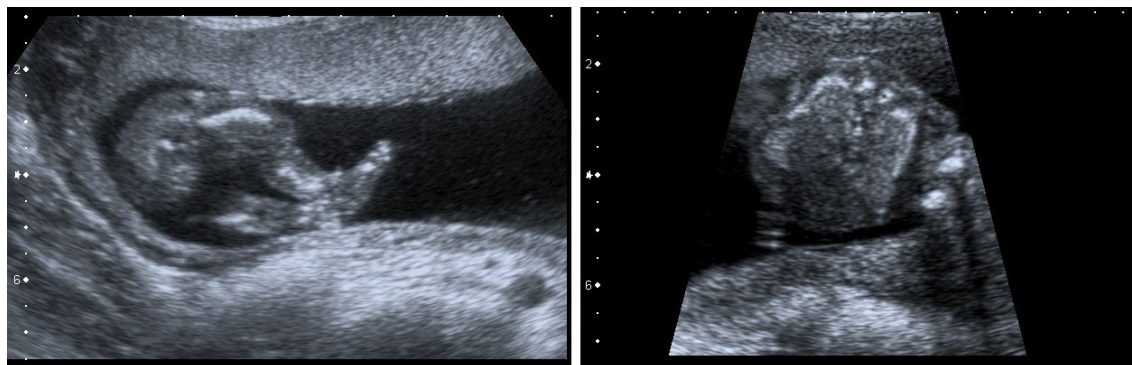
#### 4.2.1.1 Alteraciones ecográficas fetales en la gestación en curso.

En 45 casos la alteración fetal era en ese embarazo en curso: 12 casos se capturaron del periodo 1998 a 2006 y 33 muestras se recogieron en el periodo 2007-2012. En este segundo periodo el feto del caso HCSC-1 tiene dos muestras de ADN provenientes de tejidos distintos: ADN fetal en sangre materna y la muestra de líquido amniótico recogido tras la prueba para diagnóstico definitivo. Por tanto el total fueron 44 casos iniciales. El caso ACH-48 no se pudo estudiar porque el ADN estaba degradado al obtenerse de un feto con hidropesía masiva.

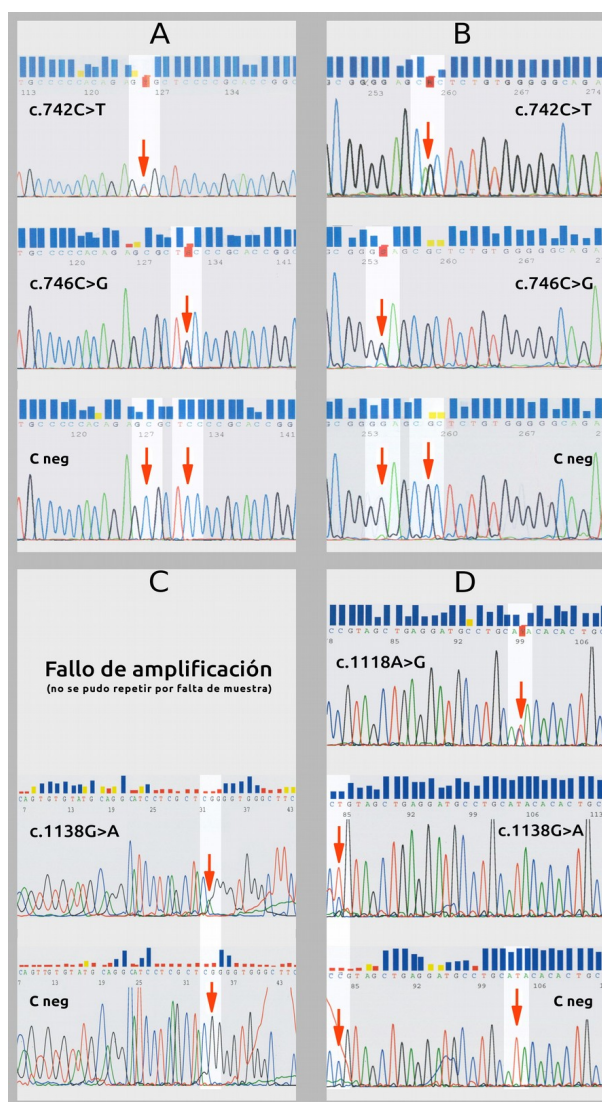
Por lo tanto, de las 44 muestras de partida se obtuvieron los siguientes resultados:

- 11 casos con resultado positivo para el gen *FGFR3* (25%):
  - 6 casos afectos de displasia tanatofórica tipo I por presentar las siguientes mutaciones:
    - 4 con la mutación c.742C>T; p.Arg248Cys (Tavormina, 1995a)). En la **figura 4.5** se observan las alteraciones ecográficas encontradas en un feto con esta mutación. En la **figura 4.6 A y B** se muestra la mutación encontrada.
    - 1 con la mutación c.746C>G; p.Ser249Cys (Tavormina, 1995b)). En la **figura 4.6 A y B** se muestra la mutación encontrada.
    - 1 con la c.1118A>G; p.Tyr373Cys (Rousseau, 1996). En la **figura 4.6 C y D** se muestra la mutación encontrada.
  - 1 caso afecto de displasia tanatofórica tipo II, mutación c.1948A>G; p.Lys650Glu (Tavormina, 1995) (**figura 4.3**);
  - 4 casos afectos de acondroplasia por presentar la mutación c.1138G>A; p.Gly380Arg (Shiang, 1994). En la **figura 4.6 C y D** se muestran la mutación encontrada.
- 2 casos afectos de aneuploidías (4,5%): una trisomía +21 compatible con un síndrome de Down (ACH-129) y una tetrasomía del 12p o síndrome de Pallister-Killian (ACH-208).
- 1 caso presentó un diagnóstico final de displasia campomélica (2,3%),
- 1 caso presentó un cariotipo aparentemente equilibrado (2,3%),
- 1 caso no se pudo estudiar por ADN degradado (2,3%),
- 28 casos resultaron negativos (65,9%)

**Figura 4.5.** Ecografías a las 15 semanas de gestación del caso ACH-105 con diagnóstico de displasia tanatofórica tipo I por presentar la mutación en heterocigosis *p.Arg248Cys*: izquierda fémur curvo. Derecha: hipoplasia torácica



**Figura 4.6.** Mutación *c.742C>T*; *p.Arg248Cys* (parte superior), *c.746C>G*; *p.Ser249Cys* (parte intermedia) y control negativo (parte baja), en un sentido (A) y en el sentido contrario (B). Mutación *c.1118A>G*; *p.Tyr373Cys* (parte superior), *c.1138G>A*; *p.Gly380Arg* (parte intermedia) y control negativo (parte baja) en un sentido (C) y en el sentido contrario (D)



En la tabla 4.2 se recogen las características y resultados de las 44 muestras recogidas en esta serie. Queda también reflejada la edad de los padres en los casos que se pudo recoger.

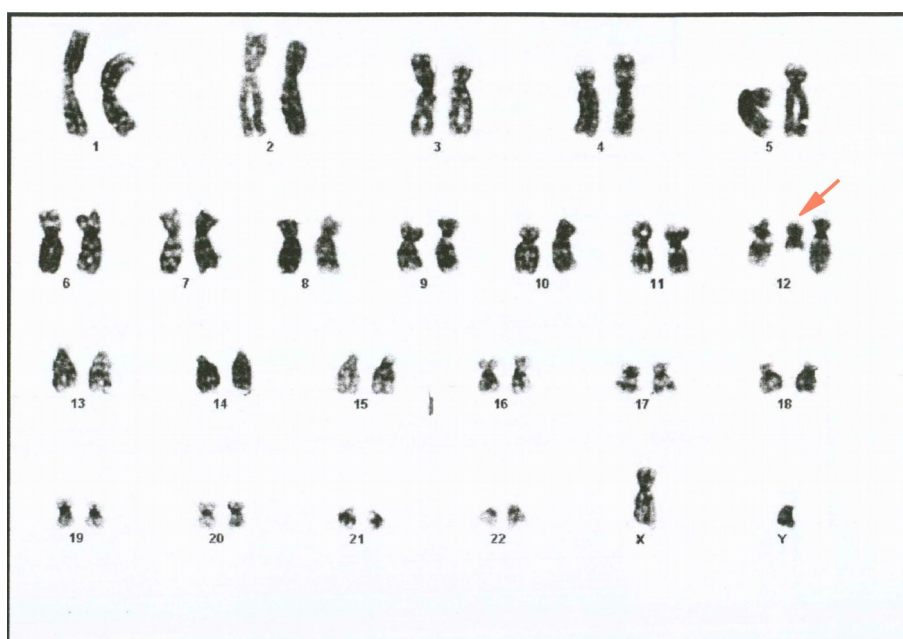
Tabla 4.2. Resultados de las alteraciones en las gestaciones en curso

FAMILIA	INDICACIÓN CLÍNICA	SEMANAS GESTACIÓN	CARIOTIPO*	RESULTADO	ALTERACIÓN ENCONTRADA	EDAD PADRE
ACH-6	DO	20	46,XYq+	Negativo	--	40
ACH-31	DO	20	46,XX	Displasia tanatofórica tipo II	FGFR3: p.Lys650Glu	35
ACH-48	DO SEVERA	19	46,XX		ADN degradado	--
ACH-65	DO	35	46,XX	Negativo	--	28
ACH-66	DO SEVERA	16	46,XY	Negativo	--	35
ACH-68	DO	14	46,XX	Negativo	--	32
ACH-83	ACH	33	46,XY	Negativo	--	DND
ACH-87	DO	24	46,XY	Negativo	--	DND
ACH-92	ACH/HCH	21	46,XX	Negativo	--	33
ACH-96	ACH	21	46,XX	Negativo	--	29
ACH-97	DT	18	46,XY	Displasia tanatofórica tipo I	FGFR3: p.Arg248Cys	48
ACH-98	ACH/HCH	30	46,XY		Negativo	--
ACH-100	ACH/HCH	19	46,XY	Negativo	--	33
ACH-105	DT	15	46,XX	Displasia tanatofórica tipo I	FGFR3: p.Arg248Cys	41
ACH-106	ACH	26	46,XY		Negativo	--
ACH-113	ANEU/ACH	14	46,XX	Negativo	--	32
ACH-126	MICROMELIA	22	46,XY	Negativo	--	37
ACH-127	DO	21	46,XY	Negativo	--	35
ACH-129	ANEU/ACH	DND	47,XY+21	Aneuploidía	47,XY+21	DND
ACH-130	DT	21	46,XY	Displasia tanatofórica tipo I	FGFR3: p.Tyr373Cys	36
ACH-137	CIR	13	46,XY		Displasia campomélica	SOX9: p.Pro451Serfs*163
ACH-193	CIR	30	46,XYt(3;8)(p23,q11.2)	Negativo	--	DND
ACH-194	ACH	15	46,XY	Negativo	--	35
ACH-208	DO	12	47,XY i(12)(p10)[18]/46,XY	Aneuploidia	47,XY i(12)(p10)mos	DND
ACH-211	DO	21	46,XX	Negativo	--	33
ACH-221	DO	29	46,XY	Acondroplasia	FGFR3: Gly380Arg	37
ACH-223	ACH	23	SRY-	Negativo	--	DND
ACH-226	DT	12	46,XX	Negativo	--	30
ACH-230	ACH	35	SRY-	Acondroplasia	FGFR3: Gly380Arg	DND
ACH-236	DO	21	46,XX	Acondroplasia	FGFR3: Gly380Arg	DND
ACH-244	ACH	16	46,XY	Negativo	--	31
ACH-263	CRANEOSINOSTOSIS	29	46,XX	Negativo	--	DND
ACH-265	DO	23	46,XY	Negativo	--	DND
ACH-283	DT	20	46,XY	Displasia tanatofórica tipo I	FGFR3: p.Arg248Cys	DND
ACH-288	ACH/OI	22	46,XY		Negativo	--
ACH-308	RIZOMELIA	22	46,XX	Displasia tanatofórica tipo I	FGFR3: p.Arg248Cys	49
ACH-310	CIR Y MICROMELIA	30	46,XY		Negativo	--
ACH-327	DT	18	46,XY	Negativo	--	DND
ACH-328	DT	17	46,XY	Displasia tanatofórica tipo I	FGFR3: p.Ser249Cys	35
ACH-340	DO	21	46,XY	Negativo	--	DND
ACH-343	MICROMELIA	33	46,XY	Negativo	--	DND
HCSC-1	LA	ACH	46,XY	Acondroplasia	FGFR3: Gly380Arg	30
	ADNF	ACH	27	SRY+	Acondroplasia	FGFR3: Gly380Arg
HCSC-2	ACH	19	46,XY	Negativo	--	DND
HCSC-3	ACH	17	46,XY	Negativo	--	31

ACH: acondroplasia. ANEU: aneuploidia. CIR: crecimiento intrauterino retardado. DND: dato no disponible. DO: displasia ósea. DT: displasia tanatofórica. HCH: hipocondroplasia. OI: osteogénesis imperfecta. \*: El sexo se obtuvo por cariotipo, FISH, QF-PCR o dato aportado por el lugar de remite

En la **figura 4.7** se muestra el cariotipo patológico encontrado en el caso ACH-208.

**Figura 4.7.** cariotipo de la familia ACH-208. Presentaba un mosaico consistente en una línea celular 46,XY y otra patológica 47,XY i(12)(p10). Compatible con síndrome de Pallister-Killian



#### 4.2.1.1.1. Resultados prenatales positivos para el gen *FGFR3*

En 5 casos de los 7 positivos para displasia tanatofórica se apartó la clínica presentada. En todos ellos destacan rizomelia e hipoplasia de tórax. Además en la tipo II, ACH-31, indicaba que el fémur era recto y que el cráneo presentaba forma en hoja de trébol, signos característicos de la displasia tanatofórica tipo II. En los mismos 5 casos el diagnóstico clínico era de displasia tanatofórica y se confirmó molecularmente. En los dos casos que no se aporta clínica, uno sólo indicaba displasia tanatofórica y en el otro feto afecto de rizomelia.

Las 4 muestras afectas de ACH presentaban rizomelia sin hipoplasia torácica, en uno de ellos además se indicaba la dismorfia facial característica de la ACH: frente abombada con puente nasal deprimido. Exceptuando la ACH-236 que indicaba micromelia y solicitaba estudio de displasia óseas en general, las otras 3 indicaban estudio de ACH.

Las semanas de gestación en las que se detectan las 7 Displasias tanatofóricas son las mismas que en los abortos, entre la 15 y la 22 cuando se realizan las ecografías de 2º TM. Las semanas de detección para los fetos afectados de ACH fueron en el 3º TM: a partir de la semana 27 de gestación en el 3º trimestre, exceptuando el caso ACH-236 con unas semanas de detección tempranas: 21.

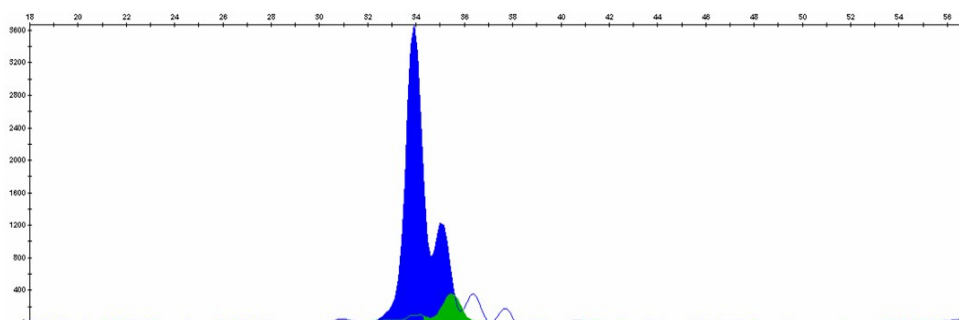
#### 4.2.1.1.1. El diagnóstico prenatal no invasivo

En nuestra serie, se pudo realizar el estudio de la mutación p.Gly380Arg detectada en el ADN fetal extraído de muestras de sangre materna, en tres embarazos en avanzado de gestación:

- ACH-223: gestante (G4V1A2) de 23 semanas, hipotiroidea, que en la ecografía del segundo trimestre se observa rizomelia leve y pie varo aducto más marcado en el derecho. Se le dio el diagnóstico de acondrogénesis o artrogriposis. Rechazó hacerse una prueba invasiva pero sí participó en la detección de la mutación p.Gly380Arg en sangre materna. El resultado fue negativo. El embarazo continuó hasta la semana 38 donde el feto falleció. Se indujo un parto de varón de 2.695g con una necropsia donde no se detecta displasia ósea. La gestante era obesa y la transmisión ecográfica en todo momento fue difícil.
- ACH-230: gemelar bicorial biamniótico. En la semana 35 se observa en el gemelo hembra un fémur <P5. Rechazó la prueba invasiva prenatal y aceptó el estudio mediante ADN fetal en sangre materna. El resultado fue positivo. Nacieron ambos fetos 3 semanas más tarde y la hembra era afecta de ACH. Se confirmó la mutación en una muestra de sangre de la neonata.
- HCSC-1: gestante de 27 semanas en cuya ecografía de tercer trimestre se observa feto con rizomelia y facies sugerentes de ACH. A la gestante se le ofrece un diagnóstico prenatal invasivo mediante amniocentesis y se le propone participar en la detección de ADN fetal en sangre materna. El resultado fue de un feto afecto de ACH por mutación c.1138G>A; p.Gly380Arg confirmado en el ADN extraído de la amniocentesis. En la **figura 4.8** se puede observar el resultado positivo del ADN fetal en sangre materna.

El estudio de todas las muestras fue realizado por la Dra. Sara Perlado Marino como parte de su trabajo de investigación.

**Figura 4.8.** Estudio de la mutación c.1138G>A en la gestante HCSC-1 mediante minisecuenciación. En color verde se muestra el nucleótido A implicado en la mutación y en color azul el nucleótido G del alelo silvestre





#### 4.2.1.1.2. Resultados prenatales negativos para el gen *FGFR3*

Veintinueve casos de las 43 muestras válidas (eliminando los casos ACH-48 y la 2ª muestra del caso HCSC-1) tuvieron un resultado negativo para los estudios tanto de cariotipo como de mutaciones en *FGFR3*. De estos 29, a 28 se les realizó una técnica invasiva para la obtención de material fetal, repartidos en función de las semanas de gestación de detección de la siguiente forma:

- Tres casos (11%) fueron solicitados en el primer trimestre: a las 12 semanas de gestación con micromelia, puente nasal deprimido y tórax estrecho con la solicitud de displasia tanatofórica; a las 13 semanas por presentar CIR con oligoamnios sin ninguna solicitud concreta, y a las 14 semanas con solicitud de displasia ósea sin descripción de la clínica encontrada.
- Diecinueve casos (68%) fueron solicitados en el segundo trimestre: entre la semana 14 y la 24 de gestación. El diagnóstico sugerido por el facultativo en 10 de los 19 casos era de ACH, a los cuales hay que sumar 4 casos en los que se indicaba estudio de displasia ósea también por micromelia.

En los 5 casos que restan hasta los 19 totales la indicación era de displasia ósea sin filiar: para ACH-127 se solicitó estudio de displasias óseas sin especificar en un feto con hipoplasia torácica; ACH-194 presentó un higroma quístico en el 1TM; ACH-211 otro feto con malformación en manos y pies; ACH-265 presentaba cardiopatía con agenesia de cuerpo calloso, sin visualización de la cámara gástrica, fémur incurvado y fracturado; ACH-340 presentó en el 1TM higroma quístico con un CIR severo en el 2TM.

- Seis casos (21%) fueron solicitados en el tercer trimestre, a partir de la semana 26: 4 solicitudes de ACH por micromelia, 1 por malformaciones fetales sin especificar en el que se indicaba displasia ósea y otro con craneosinostosis (se descartó la mutación del síndrome de Muenke).

En 20 de estos 28 casos con prueba invasiva se pudo realizar un seguimiento del embarazo. Los datos recogidos quedan reflejados en la **tabla 4.3**. De este seguimiento se obtuvo:

- 8 casos terminaron siendo fetos o recién nacidos aparentemente normales,
- 6 casos fueron interrumpidos por las malformaciones encontradas (ILEs): una displasia campomélica, 1 displasia torácica asfixiante/polimalformado, 2 ILEs sin necropsia, 1 posible cromosomopatía (ACH-194) y 1 necropsia que indicaba ausencia de osteocondrodisplasia,

- 4 casos resultaron ser una patología distinta: una cardiopatía grave, una poliquistosis renal, una gestante en tratamiento con corticoides y una artrogriposis múltiple con síndrome hipokinético,
- 1 feto polimalformado, ACH-265,
- 1 pérdida fetal tras la biopsia de corion realizada y sin diagnóstico final.

Tabla 4.3. Seguimiento de los casos negativos

FAMILIA	INDICACIÓN CLÍNICA	SEMANAS GESTACIÓN	SEGUIMIENTO	DIAGNÓSTICO PROBABLE
ACH 6	DO	20	Sin seguimiento	DESCONOCIDO
ACH 65	DO	35	Al nacimiento: cardiopatía con infarto y fisura palatina	<b>CARDIOPATÍA GRAVE</b>
ACH 66	DO Severa	16	Diagnóstico diferencial entre ACH y acondrogénesis. Sin seguimiento	DESCONOCIDO
ACH 68	DO	14	Sin seguimiento	DESCONOCIDO
ACH 83	ACH	33	Sin seguimiento	DESCONOCIDO
ACH 87	DO	24	Poliquistosis renal	<b>POLIKUISTOSIS RENAL</b>
ACH 92	ACH/HCH	21	Madre tratada con corticoides por lupus. Sin seguimiento	<b>TTO CORTICOIDES GESTANTE</b>
ACH 96	ACH	21	Sin seguimiento	DESCONOCIDO
ACH 98	ACH/HCH	30	Eco externa: hipoplasia ósea. Eco en FJD: normal. Nació un niño varón con apgar 9/9, 2900g, no se indica talla	<b>Aparentemente normal</b>
ACH 100	ACH/HCH	19	Sin seguimiento	DESCONOCIDO
ACH 106	ACH	26	Sin seguimiento	DESCONOCIDO
ACH 113	ANEU/ACH	14	Eco de 1TM, 12 semanas: SN 3mm, ligero acortamiento de extremidades. En la eco de 20 semanas todo normal	<b>Aparentemente normal</b>
ACH 126	Micromelia	22	Eco semana 32: todos los huesos largos <P3, sin alteración de tórax ni hipomineralización en calota, sin malposición de manos o pies ni calcificaciones anormales, sin prominencia frontal ni alteración en la forma de los dedos. Diagnóstico de enanismo primario. A la semana 35 se observa líquido en cantidad normal pero en la 38 se observa oligoamnios y se induce el parto. Nace un varón de 2600g apgar 7/9	<b>Aparentemente normal</b>
ACH 127	DO	21	ILE. Hipoplasia torácica	DESCONOCIDO
ACH 137	CIR	13	Cariotipo varón por ecografía hembra: reversión sexual. ILE	<b>DISPLASIA CAMPOMÉLICA [c.1242_1243insT; p.Pro451Ser/5*163]</b>
ACH 194	ACH	15	Higroma quístico 1TM. Ascitis y macrocefalia 2TM. ILE	<b>Polimalformado</b>
ACH 211	DO	21	Llama la atención la ausencia de flexión en rodillas y codos e hipoquinesia. Solicita ILE y se lo deniegan. En el GM se le diagnóstica artrogriposis donde va a parir y no se obtiene más información	<b>ARTROGRIPOSIS MÚLTIPLE CON SÍNDROME HIPOKINÉTICO</b>
ACH 226	DT	12	Tras la biopsia pierde el feto	Pérdida fetal
ACH 244	ACH	16	Sin seguimiento	DESCONOCIDO
ACH 263	Craneosinostosis	29	Sin seguimiento	DESCONOCIDO
ACH 265	DO	23	Polimalformativo	DESCONOCIDO
ACH 288	ACH/OI	22	ILE. Necropsia: sin signos de osteocondrodiasplasias	<b>Polimalformado</b>
ACH 310	CIR y micromelia	30	A las 38 semanas se induce parto por CIR. Nace varón normal	<b>Aparentemente normal</b>
ACH 327	DT	18	Se realiza biopsia por IR elevado con resultado normal. En la semana 18: edema generalizado (9 mm) con edema subcutáneo, marcada hipoplasia torácica con tórax en forma de campana, riñones hiperrrefringentes, no se visualiza vejiga, oligoamnio moderado, ambigüedad de genitales externos por lo que se realiza amniocentesis para estudio de displasia ósea. Feto polimalformado. ILE. Necropsia: orejas de implantación baja, paladar ojival. Pie derecho equino varo. Poliquistosis renal derecha. Inmadurez visceral generalizada. Placenta inmadura	<b>Displasia torácica axfisante / Polimalformado</b>
ACH 340	DO	21	Eco semana 28: CIR. Eco semana 35: dopler patológico y ausencia de movimientos fetales, por lo que se le realiza una cesárea. Nace varón. Talla baja familiar.	<b>Aparentemente normal</b>
ACH 343	Micromelia	33	Eco semana 36: ligero acortamiento fémur	<b>Aparentemente normal</b>
HCSC 2	ACH	19	En ecos posteriores: ligero acortamiento proximal y genitales ambiguos. Parto espontáneo a las 30 sem: varón buen estado, bien conformado. Peso 1080g (P10) y 34cm (P3-10). No impresiona de acortamiento de huesos largo. CIV de 1 mm. Enfermedad hialina. Genitales masculinos con hipospadias y chorda acompañante, escroto redundante y testes en bolsa. En eco se observa hidrocele bilateral moderado. Al alta pesa 2270g y 42 cm.	<b>Aparentemente normal</b>
HCSC 3	ACH	17	Padre impresión de rizomelia	<b>Aparentemente normal</b>

ACH: acondroplasia. ANEU: aneuploidías. CIR: crecimiento intrauterino retardado. DND: dato no disponible. DO: displasia ósea. DT: displasia tanatofórica HCH: hipocondroplasia. HC-P: hipoplasia cartilago-pelo. ILE: interrupción legal del embarazo. OI: osteogénesis imperfecta. TTO: tratamiento



Es decir, de 20 casos en seguimiento tras un resultado negativo para la indicación inicial de estudio de *FGFR3* por displasia esquelética, el 40% resultó tener un diagnóstico final de valores antropométricos dentro de lo normal.

#### 4.2.1.2. Estudio por un antecedente familiar en mayor o menor grado de parentesco y con estudio molecular positivo

Se recogieron 13 casos en los que existe un antecedente familiar con estudio molecular confirmatorio: 6 casos se obtuvieron en el primer periodo y 7 a partir del año 2007. En la **tabla 4.4** se muestran las características de estos casos.

**Tabla 4.4. Familias con antecedentes positivos para mutaciones en el gen *FGFR3***

FAMILIA	INDICACIÓN CLÍNICA	SEMANAS GESTACIÓN	CARIOTIPO*	RESULTADO	ALTERACIÓN ENCONTRADA	CLÍNICA
ACH 16	ACH	10	DND	Negativo	--	Madre acondroplásica (p.Gly380Arg)
ACH 23	ACH	9	46,XY	Acondroplasia	<i>FGFR3</i> : Gly380Arg	Madre acondroplásica (p.Gly380Arg)
ACH 46	DO	15	46,XX	Negativo	--	Hijo acondroplásico (p.Gly380Arg) con otra pareja
ACH 63	ACH	11	DND	Acondroplasia	<i>FGFR3</i> : Gly380Arg	Madre acondroplásica (p.Gly380Arg)
ACH 75	Muenke	15	46,XY	Negativo	--	Sobrina afecta de Sd Muenke (p.Pro250Arg)
ACH 91	ACH	14	46,XY	Acondroplasia	<i>FGFR3</i> : Gly380Arg	Madre acondroplásica (p.Gly380Arg)
105	DT tipo I	12	46,XX	Negativo	--	Feto embarazo anterior afecto de displasia tanatofórica tipo I (p.Arg248Cys)
ACH 114	ACH	12	46,XX	Negativo	--	Madre acondroplásica (p.Gly380Arg)
ACH 120	ACH	12	46,XY	Negativo	--	Hijo acondroplásico (p.Gly380Arg)
ACH 122	DT tipo II	11	46,XX	Negativo	--	Feto embarazo anterior afecto de displasia tanatofórica tipo II (p.Lys650Glu)
ACH 123	ACH	15	46,XX	Negativo	--	Hija acondroplásica (p.Gly380Arg). FIV
328	DT tipo I	12	66,XY	Negativo	--	Feto embarazo anterior afecto de displasia tanatofórica tipo I (p.Ser249Cys)
1	ACH	11	46,XX	Negativo	--	Feto embarazo anterior afecto de acondroplasia (p.Gly380Arg)

\*El sexo se obtuvo por cariotipo, FISH o QF-PCR

Los casos quedan resumidos de la siguiente forma:

- 9 acondroplasias con la mutación p.Gly380Arg. En 5 casos (56%) eran debidas a un progenitor afecto (en todos los casos, la madre). Los otros 4 casos fueron por una descendencia afecto de progenitores no afectados: 3 casos nacidos y 1 feto que fue interrumpido.
- 1 síndrome de Muenke (p.Pro250Arg), en un sobrino de la gestante
- 3 Displasias tanatofóricas: 2 del tipo I, una con la mutación p.Arg248Cys y otra con p.Ser249Cys, y 1 del tipo II con la mutación p.Lys650Glu.

En 6 de los 8 casos en los que ningún progenitor era afecto, la elección de la técnica invasiva en la gestación siguiente a la patológica fue de biopsia de corion (75%) entre las semanas 11 y 15 de gestación. En una semana tras la prueba se les dio el resultado, todos ellos negativos. Tres semanas más tarde se obtuvo el cariotipo de estas muestras, todas con resultado normal.

#### 4.2.1.3. Estudio por un antecedente familiar sin diagnóstico molecular confirmatorio

En la base de datos están recogidas 13 familias que se realizaron un estudio molecular por presentar un antecedente familiar de displasia ósea sin estudio molecular confirmatorio en la gestación anterior de un feto afecto, repartidas en 10 casos recogidos desde 1998 a 2006 y 3 de 2007 al 2012. En la tabla **tabla 4.5** se recogen las características de estos casos y el resultado obtenido.

**Tabla 4.5. Familias con estudio del gen FGFR3 por antecedente pero sin estudio molecular confirmatorio**

FAMILIA	INDICACIÓN CLÍNICA	SEMANAS GESTACIÓN	CARIOTIPO*	RESULTADO	EDAD PADRE	CLÍNICA
ACH 24	ACH	11	46,XY	Negativo	38	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
ACH 25	ACH	11	46,XY	Negativo	32	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
25	ACH	13	46,XY	Negativo	33	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
ACH 32	DO	11	46,XY	Negativo	31	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO. Consanguinidad
32	DO	11	46,XY	Negativo	35	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
ACH 55	ACH	12	46,XX	Negativo	DND	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
66	ACH	17	46,XY	Negativo	40	Feto de embarazo anterior con micromelia por ECO
ACH 70	Displasia ósea	17	DND	Negativo	39	Hija acondroplásico sin estudio molecular con otra pareja
ACH 89	ACH/HCH	11	46,XX	Negativo	29	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
89	ACH/HCH	15	DND	Negativo	31	Feto de embarazo anterior con enanismo por ECO
104	DO	13	46,XX	Negativo	43	Feto de embarazo anterior con displasia ósea por ECO
ACH 119	ACH/HCH	13	46,XY	Negativo	27	Padre con acortamiento MMSS
ACH 125	DO	15	46,XY	Negativo	37	Feto de embarazo anterior con displasia tanatofórica por ECO

\*El sexo se obtuvo por cariotipo, FISH o QF-PCR

Los antecedentes por los cuales se realiza un diagnóstico prenatal invasivo fueron:

- 8 casos por un embarazo anterior que presentaba enanismo. En tres familias, ACH-25, ACH-32 y ACH-89, se realizó el estudio en dos embarazos tras el patológico, es decir, tuvieron un primer embarazo donde se detectó un feto con “enanismo” que fue interrumpido. Le siguió otro embarazo en el que se realizó el estudio del gen *FGFR3* a pesar de

no tener un estudio molecular confirmatorio en el primer feto afecto y el estudio resultó negativo. Y hubo un tercer embarazo donde se realizó el mismo estudio de nuevo con resultado negativo.

- 2 por micromelia severa, uno en un feto de un embarazo anterior y otro por padre con este diagnóstico.
- 1 por un feto con diagnóstico clínico de displasia tanatofórica.
- 1 por feto anterior con displasia ósea.
- 1 por un hijo nacido de otra pareja con el diagnóstico de acondroplasia pero sin estudio confirmatorio.

De estos 13 diagnósticos, 8 se realizaron una prueba invasiva temprana (biopsia corial) entre la 11 y 13 semanas de gestación y 5 se realizaron una amniocentesis en un tiempo entre la semana 15 y 17.

#### 4.2.2. Gen *RMRP*

Se realizó el diagnóstico prenatal no invasivo mediante la detección de la mutación paterna en ADN fetal en sangre materna en dos embarazos consecutivos de la familia ACH-128. Esta metodología pudo realizarse tras la detección de una doble mutación en heterocigosis en el *probandus* y su comprobación en los progenitores. Los resultados de este diseño y abordaje molecular se tratan en el epígrafe 4.2.2. por lo que se pospone el desarrollo de estos resultados prenatales a ese epígrafe.

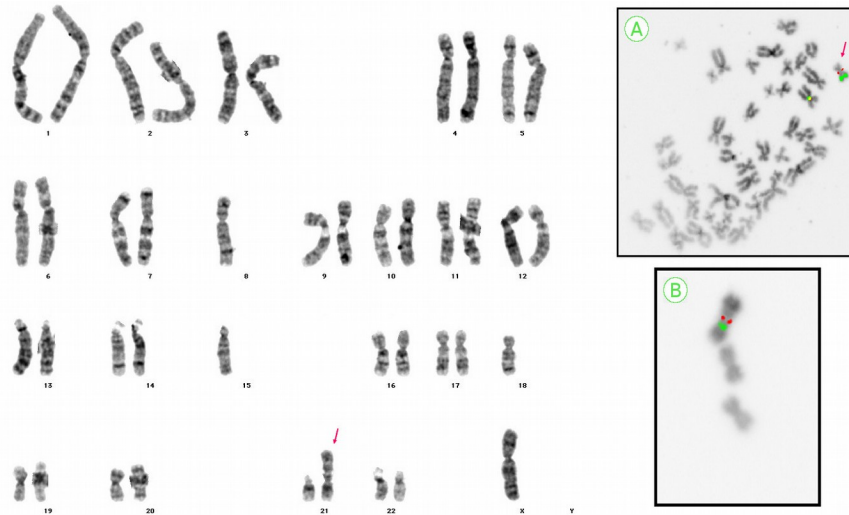
#### 4.2.3. Gen *SHOX*

En el estudio realizado al caso ACH-152 donde, debido a la presencia de un foco hiperecogénico cardíaco en la ecografía del 2º trimestre, a las 21 semanas, se decide realizar una amniocentesis para la obtención del cariotipo fetal con el resultado de 45,X,der(Y;21)(p11;p11)dn (**figura 4.9**). El FISH de las sondas para SRY, SatIII y CEPY del cromosoma Y fueron positivas así como la sonda para la región CEP 21. Es decir, se observa un cariotipo con 45 cromosomas donde se observa un cromosoma derivado de la unión de un cromosoma 21 y el cromosoma Y, de unos progenitores con cariotipo normal. Se solicitan estudios adicionales moleculares para filiar la delección.

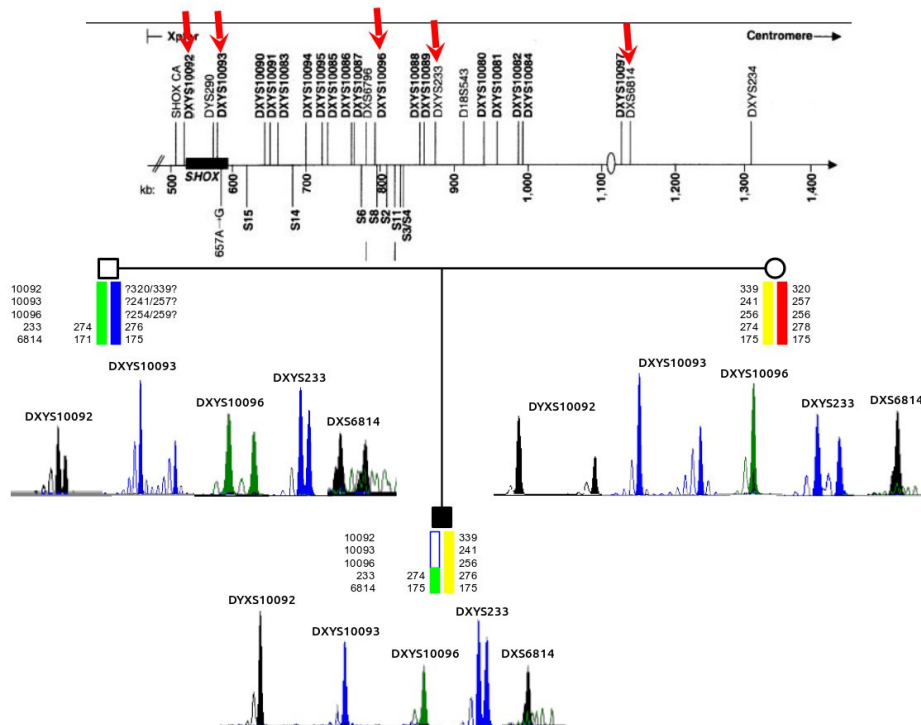
Para ello se decidió estudiar la región del PAR1 con el gen *SHOX* con el fin de delimitar la translocación. El estudio mediante la técnica de MLPA con la SALSA P018-D1 dio como resultado la delección desde la sonda 9333-L10292 a la sonda 5648-L06218, que afecta a la región 3', el gen *SHOX* así parte de la región 5', hasta unos 800-850pb en la región del PAR1. El estudio mediante los STRs DXYS10092, DXYS10093, DXYS10096, DXYS233 y DXYS6814 corroboró esta delección poniendo de manifiesto la pérdida parcial de la región pseudoautosómica

del cromosoma Y del padre (**figura 4.10**). Con este resultado se diagnosticó al feto como probable afecto de talla baja/discondrosteosis de Léri-Weill y esterilidad. El estudio de la región PAR1, tanto en el padre como en la madre, fue normal.

**Figura 4.9.** Cariotipo del feto de la familia ACH-152 donde se observa la translocación entre los cromosomas 21 e Y. Los progenitores presentaban un cariotipo normal. A: FISH para locus SRY (señal roja) y locus SATIII (señal verde); B: FISH para CEPY (señal roja) y CEP21 (señal verde)



**Figura 4.10.** estudio indirecto de la familia ACH-152. Se observa que el feto carece de los tres primeros microsatélites del padre, que corresponden a la región 3', el gen SHOX y parte de la región 5'



La pareja decidió continuar con el embarazo. En la eco de la semana 26, el foco hiperecogénico intracardiaco continuaba, la longitud de tibia, cúbito y fémur era normal pero la longitud humeral era de P5 con una posición anormal de las muñecas (**figura 4.11**). A la semana 40,6 nació de forma espontánea un varón de 51 cm (+0,37 SDS), con peso 3660g (+0,65 SDS) y perímetro craneal de 36cm (+0,96 SDS). La exploración física y neurológica fue normal, con ambos brazos y muñecas sin alteraciones apreciables. La exploración cardiopulmonar fue normal. No presentó ninguna incidencia.

A los 6 meses y 2 semanas de vida se pudo realizar una nueva exploración por parte del Dr. Leandro Soriano Guillén en la que el niño presentaba una talla de 66,5 cm (-0,11 SDS), con un peso de 8200g (+0,24 SDS) y un PC de 44,5 cm (+0,34 SDS). La medida del segmento superior era de 42cm, con una braza de 63,6 cm (3 cm menos que la talla) y un cociente segmento superior/segmento inferior de 1,71. Presentaba un fenotipo normal con buen tono y reactividad. Sin evidencias de deformidad ósea y aspecto armónico. La auscultación cardiopulmonar, abdominal y genital fue normal. Examen neurológico normal.

**Figura 4.11:** Imagen tridimensional del feto en la semana 26 de gestación en la que se observa la posición anómala de la muñeca



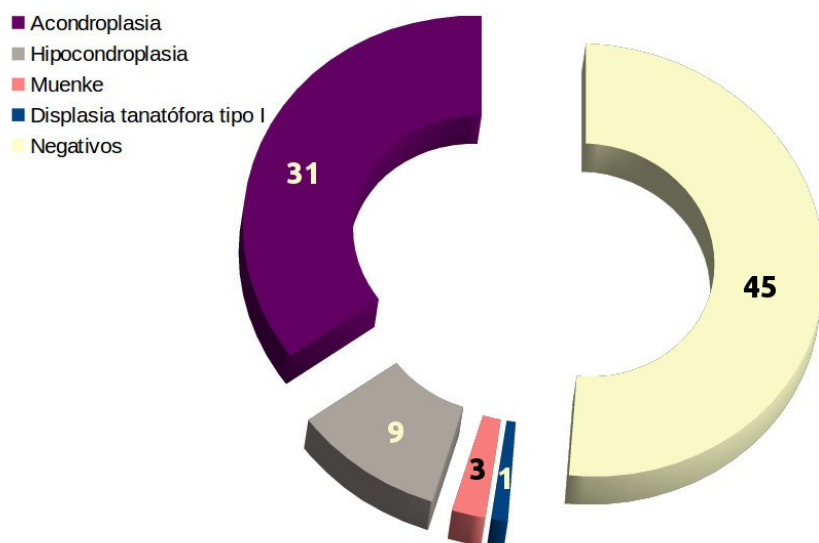
### 4.3. ESTUDIOS POSTNATALES

#### 4.3.1. Gen *FGFR3*: acondroplasia, hipocondroplasia, displasia tanatófica y síndrome de Muenke

##### 4.3.1.1. Resultados positivos

En el periodo comprendido entre 1998 al 2006, de los 58 casos tenemos un resultado positivo en 30 de ellos. En el periodo de 2007 al 2012 de los 30 casos tenemos un resultado positivo en 13. Por lo tanto, en 88 *probandi* tenemos un diagnóstico molecular en 43 casos (49% de los casos, **figura 4.12**) repartidas en las siguientes patologías:

Figura 4.12. Resultado obtenido de los 88 casos de estudios postnatales



- 31 casos (35%) de acondroplasia por mutación p.Gly380Arg (Shiang, 1994) (*figura 4.6 A y B*). En la *figura 4.13* se muestran el fenotipo presentado en dos casos afectos de ACH.
- 9 casos (10%) de hipocondroplasia por mutación p.Asn540Lys:
  - 8 casos debidos al cambio C>A (Bellus, 1995)
  - el caso ACH-42 debido al cambio C>G (Prinos, 1995) (*figura 4.14 A y B*);
- 2 casos (2%) de síndrome de Muenke por mutación p.Pro250Arg (Bellus, 1996) (*figura 4.14 C y D*);
- 1 caso (1%) de displasia tanatófora tipo I por mutación p.Arg248Cys (Tavormina, 1995) (*figura 4.6 C y D*).

En la *tabla 4.6* se muestran las características de estos 88 casos con la indicación clínica, el cariotipo obtenido, edad de diagnóstico del *probandus* y la edad del padre al nacimiento en los casos en los que se pudo recoger.



Figura 4.13: paciente ACH-1 con 3 años y paciente ACH-108 con 18 meses con aspecto acondroplásico



**Figura 4.14.** Mutación c.1620C>G; p.Asn540Lys en un sentido (A) y en el sentido contrario (B) frente a control negativo. Mutación c.749C>G; p.Pro250Arg en un sentido (C) y en el sentido contrario (D) frente a un control.

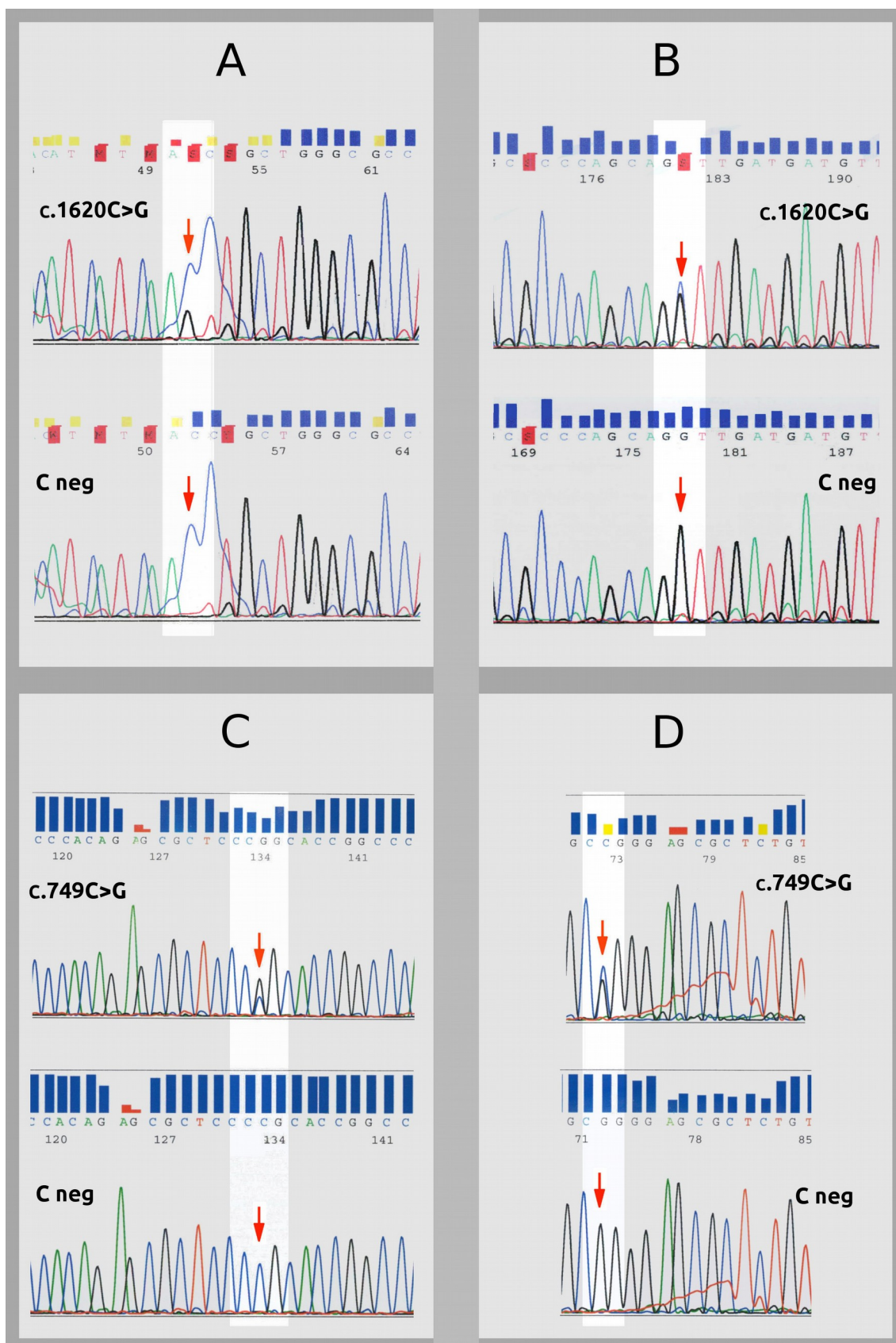


Tabla 4.6. Resultado obtenido de los 88 casos de estudios postnatales

FAMILIA	PROCEDENCIA/ AÑO	INDICACIÓN CLÍNICA	CARIOTIPO	EDAD	RESULTADO	ALTERACIÓN ENCONTRADA	EDAD PADRE AL NACIMIENTO
ACH-1	FJD/1998	ACH	46,XX	3 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	37
ACH-2	Externo/1998	ACH y HCH	46,XY	3 a	Negativo	-	36
ACH-3	Externo/1999	ACH	46,XY	33 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-5	FJD/1999	ACH y HCH	46,XY	9 sem	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	41
ACH-7	FJD/1999	ACH	46,XX	10 m	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	36
ACH-8	FJD/1999	DO	46,XY	4 m	Negativo	-	DND
ACH-9	FJD/1999	HCH	46,XX	29 a	Negativo	-	DND
ACH-10	Externo/2000	ACH	46,XX	<10 a	Negativo	-	DND
ACH-13	Externo/2000	ACH o Tanatóforo	46,XY	31 sem	Negativo	-	DND
ACH-14	FJD/2000	ACH	46,XX	3 a	Negativo	-	36
ACH-15	Externo/2000	ACH	46,XX	6 m	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-16	Externo/2000	ACH	46,XX	Adulto	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-18	Externo/2000	ACH	46,XX	6 m	Negativo	-	33
ACH-19	Externo/2000	ACH	46,XX	1 m	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	28
ACH-20	Externo/2001	ACH	46,XX	2 m	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	48
ACH-21	Externo/2001	ACH o PSACH	46,XX	5 a	<b>Hipocondroplasia</b>	p.Asn540Lys	38
ACH-23	FJD/2001	ACH	46,XX	Adulto	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-26	FJD/2001	HCH	46,XY	5 a	Negativo	-	30
ACH-27	FJD/2001	HCH	46,XX	11 a	Negativo	-	33
ACH-28	Externo/2001	ACH y HCH	46,XY	4 sem	Negativo	-	DND
ACH-29	FJD/2001	ACH	46,XY	1 sem	Negativo	-	DND
ACH-30	Externo/2001	ACH	46,XX	6 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	32
ACH-34	Externo/2002	ACH	46,XX	10 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	34
ACH-36	FJD/2002	HCH	46,XY	14 a	Negativo	-	30
ACH-38	Externo/2002	ACH	46,XX	9 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-39	Externo/2002	HCH	46,XX	8 a	Negativo	-	DND
ACH-40	Externo/2002	ACH	46,XX	8 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-41	Externo/2002	ACH	46,XY	1 a	<b>Hipocondroplasia</b>	p.Asn540Lys	DND
ACH-42	Externo/2002	ACH y HCH	46,XX	4 a	<b>Hipocondroplasia</b>	p.Asn540Lys	DND
ACH-43	Externo/2002	HCH	46,XY	11 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-44	Externo/2002	HCH	46,XX	10 a	<b>Hipocondroplasia</b>	p.Asn540Lys	DND
ACH-45	FJD/2002	ACH y HCH	46,XY	37 a	Negativo	-	DND
45	FJD/2002	ACH y HCH	46,XX	35 a	Negativo	-	DND
ACH-47	Externo/2002	ACH	46,XY	6 m	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-49	Externo/2002	ACH	46,XX	1 sem	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-50	Externo/2002	ACH y HCH	46,XX	1 sem	Negativo	-	29
50	Externo/2002	Polimorfismo 384	46,XY	29 a	Negativo	-	DND
50	Externo/2002	Polimorfismo 384	46,XX	23 a	Negativo	-	DND
50	Externo/2002	Polimorfismo 384	46,XX	Adulto	Negativo	-	DND
ACH-51	FJD/2002	Crouzon y Muenke	46,XY	34 a	Negativo	-	DND
51	FJD/2002	Crouzon y Muenke	46,XY	2 a	Negativo	-	32
ACH-52	Externo/2002	HCH	46,XY	18 a	<b>Hipocondroplasia</b>	p.Asn540Lys	30
52	Externo/2002	Polimorfismo 384	46,XX	27 a	Negativo	-	DND
52	Externo/2002	Polimorfismo 384	46,XY	30 a	Negativo	-	DND
ACH-53	Externo/2002	ACH	46,XY	DND	Negativo	-	DND
ACH-54	Externo/2002	ACH	46,XX	4 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	44
ACH-59	Externo/2003	HCH	46,XX	Adulto	Negativo	-	DND
ACH-60	Externo/2003	HCH	46,XX	2 a	Negativo	-	DND
ACH-62	Externo/2003	ACH	46,XY	1 sem	Negativo	-	DND
ACH-63	Externo/2003	ACH	46,XX	30 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	37
ACH-64	Externo/2003	PSACH	46,XY	2 a	Negativo	-	DND
ACH-73	Externo/2004	HCH	46,XY	5 a	<b>Hipocondroplasia</b>	p.Asn540Lys	DND



FAMILIA	PROCEDENCIA/ AÑO	INDICACIÓN CLÍNICA	CARIOTIPO	EDAD	RESULTADO	ALTERACIÓN ENCONTRADA	EDAD PADRE AL NACIMIENTO
ACH-74	Externo/2004	ACH	46,XY	7 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	>50
ACH-76	FJD/2004	ACH y HCH	46,XX	4 a	Negativo	-	DND
ACH-77	Externo/2004	Displasia tanatofórica	DND	1 sem	<b>Displasia tanatofórica tipo I</b>	p.Arg248Cys	DND
ACH-78	Externo/2004	ACH	46,XX	36 a	Negativo	-	DND
ACH-79	Externo/2004	PSACH	46,XX	12 a	Negativo	-	DND
ACH-80	Externo/2005	ACH	46,XY	1 sem	Negativo	-	DND
ACH-81	Externo/2005	HCH	46,XX	31 a	Negativo	-	DND
ACH-84	Externo/2005	ACH y HCH	46,XX	9 a	Negativo	-	DND
ACH-88	Externo/2005	ACH y HCH	46,XY	15 m	<b>Hipocondroplasia</b>	p.Asn540Lys	37
ACH-91	FJD/2006	ACH y HCH	46,XX	36 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	>40
ACH-94	Externo/2006	HCH	46,XY	1 sem	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-95	Externo/2006	ACH	46,XX	7 m	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-99	Externo/2006	Crouzon	46,XY	4 m	Negativo	-	37
ACH-101	Externo/2007	Displasia tanatofórica	46,XX	1 sem	Negativo	-	DND
ACH-102	Externo/2007	HCH/PSCH	46,XY	18 m	Negativo	-	DND
ACH-103	Externo/2007	Displasia ósea	46,XY	2 a	Negativo	-	29
ACH-108	Externo/2007	ACH	46,XX	18 m	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	38
ACH-110	Externo/2007	ACH	46,XX	3 m	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-112	Externo/2008	HCH	46,XX	32 a	Negativo	-	34
ACH-114	Externo/2008	ACH	46,XX	39 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-116	Externo/2008	ACH	46,XY	adulto	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-119	Externo/2008	Displasia ósea	46,XY	27 a	Negativo	-	28
ACH-120	FJD/2008	ACH	46,XY	<10 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	38
ACH-145	FJD/2008	HCH	46,XY	1 a	Negativo	-	DND
ACH-154	FJD/2008	ACH	46,XX	<1 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	40
ACH-159	Externo/2009	HCH	46,XY	3 a	Negativo	-	DND
ACH-170	Externo/2009	HCH/Aarskog- Scott	46,XY	8 a	Negativo	-	DND
ACH-178	Externo/2009	ACH	46,XY	3 m	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	31
ACH-182	FJD/2009	ACH	46,XY	1 m	Negativo	-	DND
ACH-185	Externo/2009	Displasia tanatofórica	46,XY	1 m	Negativo	-	DND
ACH-186	Externo/2009	HCH	46,XY	3 a	<b>Raquitismo hipofosfatémico ligado al X</b>	p.Arg549* gen PHEX	DND
ACH-197	Externo/2010	padre	46,XY	adulto	Negativo	-	DND
197	Externo/2010	madre	46,XX	adulto	Muenke	p.Pro250Arg	DND
197	Externo/2010	Crouzon	46,XY	3 a	Muenke	p.Pro250Arg	DND
ACH-204	Externo/2010	ACH	46,XY	37 a	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	DND
ACH-210	FJD/2010	Displasia metafisaria	46,XY	35 a	Negativo	-	43
ACH-222	FJD/2010	padre	46,XY	35 a	Negativo	-	DND
222	FJD/2010	madre	46,XX	33 a	Negativo	-	DND
222	FJD/2010	Craneosinostosis	46,XY	1 m	<b>Muenke</b>	p.Pro250Arg	35
ACH-227	FJD/2011	HCH	46,XY	31 a	<b>Hipocondroplasia</b>	p.Asn540Lys	31
ACH-230	FJD/2011	ACH	46,XX	1 sem	<b>Acondroplasia</b>	p.Gly380Arg	38
ACH-242	FJD/2011	Micromelia prenatal	46,XX	1 m	Negativo	-	DND
ACH-279	FJD/2012	HCH	46,XX	30 a	Negativo	-	27
ACH-282	Externo/2012	HCH	46,XY	1 a	<b>Hipocondroplasia</b>	p.Asn540Lys	37
ACH-311	Externo/2012	HCH	46,XY	10 a	Negativo	-	DND
ACH-331	Externo/2012	HCH	46,XX	4 a	Negativo	-	DND
ACH-332	FJD/2012	Craneosinostosis	46,XX	3 a	Negativo	-	DND

ACH: acondroplasia; DND: dato no disponible; DO: Displasia ósea; HCH: hipocondroplasia; PSACH: Pseudoacondroplasia  
Edad: a: años; m: meses; sem: semanas

De los 31 casos positivos para la ACH, en 27 es la única petición solicitada por el facultativo (87%), en 2 se solicita ACH/HCH (6,5%) y otros 2 casos se solicita exclusivamente estudio de HCH.

La edad de diagnóstico fue en 13 casos (42%) antes de 1 año de vida y 9 casos (29%) entre 1 y 10 años. El único caso que venía con una pequeña explicación del fenotipo del paciente es la familia ACH-1 en la que se detallaba una niña de 3 años con una talla en P10 y una serie ósea donde se destaca unas extremidades inferiores de aspecto displásicos con metáfisis irregulares y acetábulo plano, signo característico de este desorden. Se pudo realizar fotografía (**figura 4.13**) en la que se observaba el aspecto característico de talla baja desproporcionada rizomélica con cabeza macrocefálica, frente prominente, puente nasal deprimido e hipoplasia media facial.

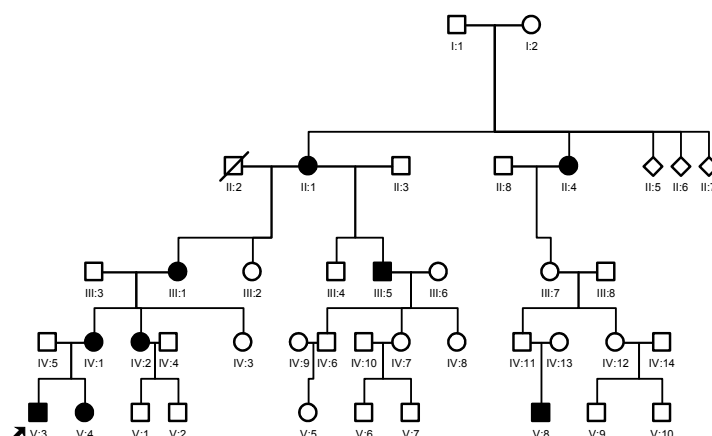
En los 9 casos positivos para la HCH la solicitud del facultativo fue de HCH en 5 casos, 2 la clínica no permitía distinguir entre ACH/HCH, en 1 caso se solicitó estudio de ACH y en otro se pensó en una ACH/PSCH. Los 9 casos de HCH detectados presentaron una edad de diagnóstica menor de 10 años en 7 de los 9 casos (78%). Exceptuando el caso ACH-282, en los demás no se detalló los signos clínicos que llevaron a estas suposiciones. Al caso ACH-282 era un varón de 1 año con estancamiento pondoestatural a los 11 meses y talla de -3,58SDS). Al nacimiento presentó talla normal (-0,36SDS). Aporta radiología ósea en la que se destaca macrocrania, acortamiento de ambos radios con subluxación de los mismos, angulación de ambos cúbitos, ensanchamiento metafisario de ambos húmeros distales y tibias proximales con acortamiento de ambos fémures.

En el caso positivo para displasia tanatofórica tipo I sólo tenemos el dato de ser un embarazo gemelar a término en la que uno de los gemelos nacidos debía presentar una clínica muy compatible con Displasia tanatofórica tipo I porque fue lo único que se solicitó para estudio. La muestra enviada fue sangre periférica de un neonato de 10 días de vida.

Existen 5 casos con solicitud de craneosinostosis, síndrome de Crouzon y/o de Muenke. Sólo 2 casos resultaron positivos para la mutación c.749C>G [p.-Pro250Arg] responsable de la afectación del síndrome de Muenke:

- Caso ACH-197: un niño de 3 años diagnosticado de síndrome de Crouzon, intervenido de plagiocefalia y con una extensa familia de afectados (**figura 4.15**). A raíz de encontrar la mutación patogénica, fueron rediagnosticados de síndrome de Muenke toda la familia.

Figura 4.15. Árbol genealógico del caso ACH-197



- Familia ACH-222: en un varón de 1 mes de vida con turricefalia, orejas de implantación bajas y fontanela anterior pequeña. No existían casos de afectados en otros familiares. La solicitud del facultativo fue de estudio de craneosinostosis.

#### 4.3.1.1.1. Polimorfismos

En los estudios de secuenciación realizados se han encontrado 7 polimorfismos ya descritos. En la **tabla 4.7** se muestra la frecuencia del alelo menor en nuestra población afecta y las publicadas.

Los dos polimorfismos del exón 7, rs2234909 y rs2305184, cosegregan conjuntamente, de modo que aparecen en heterocigocidad u homocigocidad simultáneamente.

La variante c.1150T>C [p.Phe384Leu, rs17881656] fue descrita en 2004 por Trujillo-Tiebas y col con una frecuencia en la población general (97 individuos) de 0,0005%, 1 variante en 194 alelos. La frecuencia del alelo menor publicada en la base de datos SNPs es de 0,0008 y en ella se indica que la relevancia clínica no se conoce.

Esta variante se ha detectado en 5 casos. Nuestra frecuencia es muy superior a la encontrada en la bibliografía y además siempre heredada de un progenitor con o sin clínica sugerente, por lo que no se puede establecer una segregación con clínica.

Tabla 4.7. Polimorfismos encontrados en el estudio del gen FGFR3.

		Exón 7		Exón 9	Exón 13		Exón 14	
Familia	Resultado	rs2234909	rs2305184	rs17881656	rs3135897	rs370408732	rs7688609	rs143130353
ACH-7	Acondroplasia				c.1647G>T p.Gly549			
ACH-8	Negativo							c.*23G>A
ACH-50	Negativo			c.1150T>Cpat p.Phe384Leu				
50	Negativo			c.1150T>C p.Phe384Leu				
50	Negativo			c.1150T>C p.Phe384Leu				
ACH-52	Hipocondroplasia			c.1150T>Cmat p.Phe384Leu				
52	Negativo			c.1150T>C p.Phe384Leu				
ACH-53	Negativo	c.882T>C p.Asn294	c.930+72C>G					
ACH-78	Negativo				c.1647G>T p.Gly549			
ACH-84	Negativo	c.882T>C p.Asn294	c.930+72C>G					
ACH-85	Negativo			c.1150T>C p.Phe384Leu				
85	Negativo			c.1150T>C p.Phe384Leu				
ACH-94	Acondroplasia				c.1647G>T p.Gly549			
ACH-102	Negativo				c.1647G>T p.Gly549			
ACH-112	Negativo	c.882T>C homocigosidad p.Asn294	c.930+72C>G homocigosidad					
ACH-148	SHOX +						c.1953A>G homocigosidad p.Thr651 homocigosidad	
ACH-170	Negativo						c.1953A>G p.Thr651	
ACH-221	Acondroplasia					c.1671C>T p.Tyr557		
ACH-279	Negativo	c.882T>C p.Asn294	c.930+72C>G					
ACH-285	Negativo			c.1150T>Cmat p.Phe384Leu				
ACH-311	Negativo	c.882T>C p.Asn294	c.930+72C>G					
HCSC-1	Acondroplasia			c.1150T>Cmat p.Phe384Leu				
1	Negativo			c.1150T>Cmat p.Phe384Leu				
Frecuencia del alelo menor	En nuestra serie	0,1153	0,1153	0,0266	0,0125	0,0031	0,0099	0,0033
	Publicado	0,181	0,181	0,0008 – 0,003	0,0198	0,0002	0,0439	Desconocido
	ABORTO							
	PRENATAL							

#### 4.3.1.2. Resultados negativos para el gen *FGFR3*

En 45 de los 88 casos iniciales se obtuvo un resultado negativo para el gen *FGFR3*. Poder ampliar el estudio requiere tener acceso a la clínica de los pacientes, sin embargo, en nuestra serie, sólo hay 28 casos de los 88 totales en los que se describe el fenotipo del paciente, y de éstos, sólo 8 daban el resultado del estudio radiológico tan importante en esta patología.

En las 45 familias con estudio inicial negativo, se contactó con el facultativo responsable/paciente para ampliar el estudio a los genes *SHOX*, *COMP* o *FGFR2* en función de la patología presentada (**tabla 4.9**). En 13 casos se decidió no ampliar el estudio. De estos 13 casos, tenemos dos casos con un diagnóstico probable:

- ACH-170: tras nueva revaluación se sospechó de un síndrome de Aarskog-Scott o displasia facio-genital ligada al X. Se le estaba estudiando el gen *FGD1*. Este síndrome se caracteriza por talla baja, hipertelorismo, escroto en alforja y braquidactilia principalmente.
- ACH-185: en un neonato con hipoplásica torácica y distrés respiratorio que le provocó la muerte al mes y medio de vida. El diagnóstico diferencial era de displasia tanatofórica tipo I *versus* al síndrome de Kniest. Al resultar negativo el estudio de *FGFR3*, el diagnóstico probable era de displasia de Kniest.

**Tabla 4.9. Características clínicas de los resultados negativos para el gen *FGFR3* y los estudios complementarios realizados**

FAMILIA	AMPLIACIÓN ESTUDIO	RESULTADO	ALTERACIÓN ENCONTRADA	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO PROBABLE
ACH-2	NO	-	-	Al nacimiento macrocefalia, talla corta y rizomelia.	Desconocido
ACH-8	<i>SHOX</i>	Negativo	-	En el embarazo se detecta fémur corto en el 3TM. Al nacimiento RX que descarta ACH. Leve acortamiento rizomelia de EESS e II.	Poco probable patología por mutaciones en <i>FGFR3</i>
ACH-9	NO	-	-	DND	Desconocido
ACH-10	NO	-	-	DND	Desconocido
ACH-13	<i>SHOX</i>	Negativo	-	Varón prematuro de 31 semanas, CIR severo, fémur corto o incurvados sin fracturas, desproporción entre cráneo y el cuerpo y entre el segmento superior y el inferior. Cráneo poco osificado. Antecedentes de otro feto fallecido con iguales signos.	Possible alteración gen <i>SHOX</i>
ACH-14	<i>SHOX</i>	Negativo	-	Talla baja, retraso psicomotor y del lenguaje leve, dermatitis atópica, defecto óseo a nivel frontal, hipoacusia del oído izquierdo y mano en tridente.	Probable síndrome cromosómico
ACH-18	<i>SHOX</i>	Negativo	-	Al nacimiento, pretérmino 35 semanas y 860g, CIR severo, talla de 42 cm (<P3) y PC 35 cm. Asfixia neonatal leve. Con 6 meses megacefalia y talla baja con acortamiento de extremidades. Manos cortas con aspecto en tridentes. El mapa óseo presenta acortamiento de extremidades y no alteraciones en vértebras.	Poco probable patología por mutaciones en <i>FGFR3</i>
ACH-26	<i>SHOX</i>	Negativo	-	En embarazo en 32 se detecta fémur corto. Al nacimiento talla baja (>P3) y miembros cortos. Con 5 años: Braquicefalia. Micrognatia, cuello corto, tórax en quilla, leve cortidaz rizomelia. RX: platiespondilia lumbar con palas ilíacas algo más cortas, marcada disminución y deformidad de cabezas femorales y humerales, así como acetábulo. Con 15 años, talla de 150cm (-2,4SDS). Obesidad moderada, rizomelia en MMSS, miopía, no dismorfia facial.	¿Displasia espondiloepifisaria?

## Genes asociados a displasias esqueléticas

FAMILIA	AMPLIACIÓN ESTUDIO	RESULTADO	ALTERACIÓN ENCONTRADA	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO PROBABLE
ACH-27	SHOX	Negativo	-	Consanguineidad. Talla baja con -2,5SDS y rizomelia como el padre y abuela paterna. 14 años; peso 4301g (P14, -1,11DE), talla 132,1 cm (P<1, -4,44DE), IMC 24,7 (P84, 1,01DE). Vcre: 2,8cm/año (P90, 1,3DE).	Displasias rizomélicas y epifisarias
ACH-28	SHOX	SHOX+	Deleción heterocigota del gen SHOX desde el gen PP2R3B en región 3' hasta el exón 6A	DND	Alteración gen SHOX+
ACH-29	NO	-	-	Pretérmino de 33 semanas. Embarazo: 28 semanas polihidramnios, tórax hipoplásico y miembros cortos. Al nacimiento aspecto hidrópico, criptorquidia bilateral, orejas displásicas, macrocefalia P>90, hipertelorismo discreto, mejillas prominentes, micrognatia leve, frente prominente, cuello corto con piel redundante, tórax corto y ancho, mamilas hipoplásicas y separadas.	Desconocido
ACH-36	SHOX	Negativo	-	Hiperlordosis, acortamiento rizomélico de extremidades, no macrocefalia. Madre 142,5cm.	Desconocido
ACH-39	NO	-	-	DND	Desconocido
ACH-45	SHOX	Negativo	-	137cm de talla armónica. Feto con DO+monosomía 21	Desconocido
ACH-50	SHOX	Negativo	-	DND	Desconocido
50	SHOX	Negativo	-	161cm de talla	Desconocido
ACH-51	FGFR2	Negativo	-	DND	Desconocido
51	FGFR2	Negativo	-	DND	Desconocido
ACH-53	SHOX	Negativo	-	DND	Desconocido
ACH-59	SHOX	Negativo	-	Talla 135cm, desproporcionada, no alteraciones faciales, antecedentes paternos.	Desconocido
ACH-60	NO	-	-	DND	Desconocido
ACH-62	NO	-	-	DND	Desconocido
ACH-64	SHOX y COMP	Negativo	-	Hermano afecto fallecido	¿Pseudocondroplasia?
ACH-76	NO	-	-	DND	Desconocido
ACH-78	SHOX	Negativo	-	De novo. Se pide ACH para diagnóstico diferencial	Displasiaespondiloepifisaria vs sd de Kniest
ACH-79	SHOX	Negativo	-	DND	¿Pseudocondroplasia?
ACH-80	NO	-	-	DND	Desconocido
ACH-81	SHOX	SHOX+	Duplicación de todo el gen SHOX y parte de la región 5' adyacente	DND	Alteración gen SHOX+
ACH-84	SHOX	Negativo	-	DND	Desconocido
ACH-99	NO	-	-	Neonato de 39+1 semana-. Peso 3000g (P25-50); talla 47cm (P10-25) PC en P10. Hipotonía cervical. Pliegue nual redundante con cuello corto. Cabeza con morfología turricéflica, fontanela anterior amplia, dehiscencia de suturas. Raíz nasal ancha.	Desconocido
ACH-101	NO	-	-	Falleció a las pocas horas de vida	Desconocido
ACH-102	SHOX y COMP	Negativo	-	Metáfisis anchas y puntiagudas fémur y tibias. Diáfisis de huesos anchas. Cúbitos ligeramente acortados.	¿Pseudocondroplasia?
ACH-103	SHOX	Negativo	-	Pelvis pequeña, acortamiento asimétrico de MMII, ensanchamiento de metáfisis, metáfisis en V del fémur distal	¿síndrome Dyggve-Melchior-Clausen?
ACH-112	SHOX	SHOX+	Deleción heterocigota del gen SHOX desde el gen PP2R3B en región 3' hasta el exón 6A	Talla: 103 cm, peso 34,5Kg y PC51 cm	Alteración gen SHOX+
ACH-119	SHOX y COMP	Negativo	-	Acortamiento MMSS	Desconocido
ACH-145	SHOX	Negativo	-	Eco prenatal: rizomelia de EESS e II. Madre en centro de acogida. Al nacer 2700g, talla 45 cm, PC 34,7cm	Desconocido
ACH-159	SHOX y COMP	Negativo	-	Talla baja, acortamiento EE y macrocefalia. Serie ósea: ausencia de ensanchamiento vertebral.	Poco probable patología por mutaciones en FGFR3
ACH-170	NO	-	-	Braquidactilia; escroto en alforja. Se le está estudiando el gen FGD1	Síndrome de Aarskog-Scott
ACH-182	SHOX	Negativo	-	Prenatal: polihidramnios. Al nacimiento: 3500g y talla 51 cm con PC 38cm. Al mes frente olímpica, puente nasal deprimido, filtrum corto y paladar ojival. MMSS algo acortados y no proporcionados respecto al tórax-abdomen.	Desconocido

FAMILIA	AMPLIACIÓN ESTUDIO	RESULTADO	ALTERACIÓN ENCONTRADA	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO PROBABLE
ACH-185	NO	-	-	Eo 3TM hipoplasia torácica y polihidramnios. Al nacimiento a las 34 sem presenta dificultad respiratoria que provoca la muerte al mes y media de vida por parada cardiorrespiratoria. RX: vértebras pequeñas escasamente mineralizadas, costillas cortas y adelgazadas con extremos ensanchados, huesos largos cortos de aspecto tosco, con epífisis ensanchadas y alas ilíacas pequeñas con morfología en tridente en la cara acetabular y ensanchamiento de la sínfisis en pubis. Volúmenes pulmonares pequeños con prominencia tímica. Se hace autopsia.	Síndrome de Kniest
ACH-186	<i>SHOX</i>	Negativo	-	Fenotipo de HCH	Raquitismo hipofosfatémico ligado al X [gen <i>PHEX</i> : c.1645 C>T; p.Arg549*]
ACH-210	<i>SHOX</i> y <i>COMP</i>	Negativo	-	Diagnóstico desde los 4 años de displasia metafisaria, portador de muleta desde los 13 años.	¿Síndrome de Kniest?
ACH-242	<i>SHOX</i>	Negativo	-	Micromelia prenatal	Normal
ACH-279	<i>SHOX</i>	Negativo	-	Talla 128cm, hiperlordosis, desproporción de MMSS, falanges y metacarpianos cortos, rotación interna de rodillas. AF de talla baja por rama materna sin desproporción.	¿Síndrome de stickler?
ACH-311	<i>SHOX</i>	Negativo	-	Talla baja y mesomelia. Serie ósea: ausencia de aumento de distancia interpeduncular lumbar y edad ósea retrasada.	Poco probable patología por mutaciones en <i>FGFR3</i>
ACH-331	<i>SHOX</i>	Negativo	-	Talla baja, micromelia con rizomelia, braquidactilia. Se parece a la madre.	Desconocido
ACH-332	<i>FGFR2</i>	Negativo	-	Plagiocefalia secundaria a craneosinostosis coronal izquierda, intervenida con muy buenos resultados.	Craneosinostosis no síndromica

ACH: acondroplasia; DND: dato no disponible; DO: Displasia ósea; FM: falta muestra; HCH: hipocondroplasia; PSACH: Pseudoacondroplasia  
Edad: a: años; m: meses; sem: semanas

Los estudios realizados a las 32 familias a las que sí se amplió, fueron:

- 30 casos para estudio del gen *SHOX* con 3 resultados positivos: ACH-28, ACH-81 y ACH-112; y un posible 4º resultado positivo en el caso ACH-13. Estos resultados se comentarán en el apartado del gen *SHOX* (4.3.6.1.1. Grupo *FGFR3*).
- 5 casos que, además del gen *SHOX*, se les estudió el gen *COMP*. Todos ellos negativos.
- 2 casos para estudio del gen *FGFR2*. Todos negativos.

Por tanto, se resolvieron 4 casos (13,3%) de los 30 casos negativos.

Entre los 28 casos negativos restantes, 18 casos tienen un diagnóstico final o probable de una patología no relacionada con los genes estudiados en esta tesis:

- *Posible pseudoacondroplasia*:
  - ACH-64: niño de 2 años de República Dominicana que presentaba un hermano fallecido con igual diagnóstico. Sólo se pudo realizar el exón 13 por falta de muestra.
  - ACH-79: una niña de 12 años de la República Dominicana. Sin clínica descrita.
  - ACH-102: en un varón de 18 meses que presentaba un fenotipo de desproporción con una indicación clínica de HCH o PSACH.

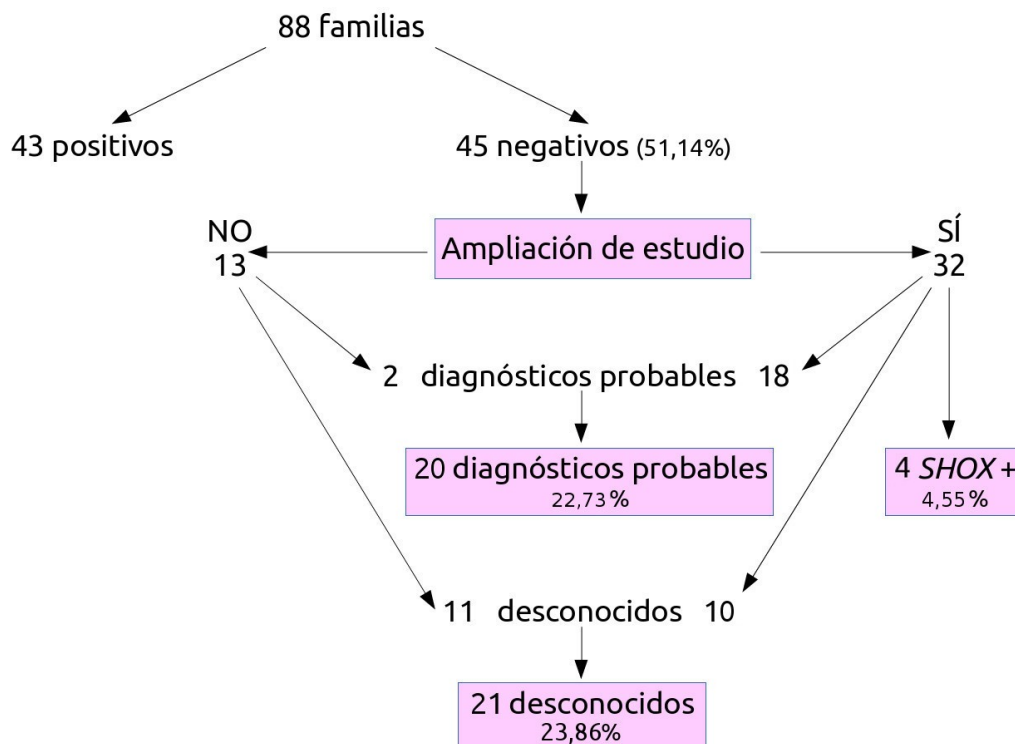
- ACH-119: varón de 27 años con acortamiento de miembros superiores en los que se sospecha una PSACH.
- *Displasia espondiloepifisaria*:
  - ACH-26: varón de 5 años con fenotipo sugerente de HCH. A los 15 años se sugiere una displasia espondiloepifisaria más leve que la congénita y más grave que la tardía.
  - ACH-78: mujer de 35 años con diagnóstico de displasia de Kniest o displasia espondiloepifisaria que se solicita estudio de *FGFR3* para diagnóstico diferencial.
- *Displasia rizomélica y epifisaria*: caso ACH-27: varón de 11 años con talla baja y rizomelia que ya presentaba su padre y su abuela paterna. En un principio el fenotipo le sugirió al pediatra HCH pero con el paso del tiempo lo englobó dentro de las displasias epifisarias con rizomelia.
- *Displasia de Kniest*: en 2 casos, ACH-78 y la ACH-210.
- *Síndrome de Dyggve-Melchior-Clausen*: ACH-103 en una niña de dos años con talla baja desproporcionada. El estudio radiológico realizado con posterioridad sugirió este diagnóstico.
- *Raquitismo hipofosfatémico ligado al X*: en el caso ACH-186 que era un varón de 3 años con fenotipo sugerente de HCH. Tras estudio negativo y nueva reevaluación, se diagnosticó de raquitismo hipofosfatémico ligado al X, confirmado al encontrar la mutación c.1645C>T en hemigiosidad (p.Arg549\*) en el gen *PHEX*.
- *Síndrome de Stickler*: en el caso ACH-279, en una mujer de 30 años con talla baja desproporcionada que presenta un hijo con clínica similar. El estudio de *COL2A1* responsable de esta enfermedad, resultó negativo lo que lo hace menos probable.
- *Craneosinostosis no sindrómica*: en el caso ACH-332 de una niña de 3 años intervenida de plagiocefalia secundaria a craneosinostosis coronal izquierda con resultados tras la intervención muy buenos.
- *Poco probable de ser una patología por mutaciones en el gen FGFR3*:
  - ACH-8 se detectó un fémur corto en el embarazo con un fenotipo a los 4 meses de leve acortamiento en extremidades.
  - ACH-18: corresponde a un pretérmino con CIR severo de 6 meses en el momento de estudio.



- ACH-159 y ACH-311: ambos con talla baja y acortamiento de miembros con estudios realizados a los 3 y 10 años en los que la series ósea descartaba HCH.
- *Probable síndrome cromosómico*: caso ACH-14 en una niña de 3 años que presentaba un cuadro de retraso psicomotor y de adquisición del lenguaje con hipoacusia unilateral.
- *Normal*: en el caso ACH-242: neonata que en su etapa prenatal se observó micromelia. Al nacimiento no se objetivó pero al mes de vida se realizó cariotipo y estudio de *FGFR3* para descartar HCH. Todos los estudios fueron negativos y ante ausencia de clínica, se consideró que presentaba un fenotipo dentro de la normalidad.

Haciendo un resumen, de las 88 familias iniciales, 47 casos resultaron positivos (43 del gen *FGFR3* y 4 del gen *SHOX*) que constituye el 53,4%. Un diagnóstico probable lo presentaron 20 casos (22,74%) y 21 se desconoce el diagnóstico clínico para su patología (23,86%) (**figura 4.16**).

**Figura 4.16. Diagrama de resultados obtenidos para estudios postnatales en el gen *FGFR3*.**



#### 4.3.1.3. La edad paterna

El dato de la edad paterna fue difícil de obtener sobre todo en los casos del periodo previo a la concesión del proyecto, antes del año 2007, y especialmente en las muestras prenatales.

Sumando las muestras prenatales y de abortos tenemos 69 casos totales, en 39 de los cuales tenemos el dato de la edad paterna y resultado (57%). De los 88 casos englobados en el epígrafe de postnatal, tenemos el resultado de la edad paterna al nacimiento del paciente en 37 casos (42%).

En los resultados postnatales, para conocer el efecto de la edad paterna en las mutaciones *de novo* y eliminando los 21 casos con diagnóstico probable en una patología distinta a mutaciones en el gen *FGFR3*, los 4 casos de pacientes con alteraciones en el gen *SHOX* y el caso ACH-197 en el que el síndrome de Muenke era heredado en el paciente a estudio, tenemos que de los 88 casos iniciales, nos quedamos con 62 casos con una patología *de novo* en el gen *FGFR3*. El dato de la edad paterna en este caso lo tenemos en 27 casos (44%).

Entre las 36 familias de las que no tenemos el dato de la edad paterna al nacimiento del paciente, hay 20 casos positivos para el gen *FGFR3*. Entre estas 62 casos, tenemos 8 casos de muestras procedentes de la República Dominicana, realizadas por un contacto directo con un médico que trabajaba en ese país, al que se le realizó el estudio de ACH y/o HCH en pacientes muy bien seleccionados, a partir de muestras bucales, y sin ningún coste pero de los que no tenemos ningún dato clínico. Seis casos fueron positivos.

Si sumamos todos los casos prenatales y postnatales, tenemos un total de 134 muestras. Conocemos el dato de la edad paterna en 64 de ellos (37 de prenatal y abortos junto a las 27 de postnatal) que constituyen el 47,8%. De estos casos, padres con edad mayor o igual de 35 durante la gestación son 38 (59,4% de los 64) y con un resultado positivo para mutaciones en el gen *FGFR3*, 26 casos (68,4% de los 38 con estas edades). Por otro lado, padres con edad inferior a 35 años hay 26 (40,6% de los 64) y con un resultado positivo para mutaciones en el gen *FGFR3*, 9 casos (34,6% de los 26).

A partir de nuestra muestra, se exploró si había diferencias significativas entre la media de edad paterna del grupo 1 (afectos *FGFR3*+) y la del grupo 2 (afectos *FGFR3*-), y el tamaño del efecto de dichas diferencias. Para ello, tras haber comprobado la normalidad (test de Shapiro-Wilk  $p < .05$  para ambos grupos) y la homocedasticidad (Test de Levene  $p > .05$ ) en la distribución de los datos, se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA) asumiendo la “edad” como variable dependiente y “si es positivo” como factor. Los resultados indicaron que la media de edad paterna del grupo 1 ( $n = 34$ ;  $M = 37.61$ ;  $SD = 5.6$ ) respecto al grupo 2

( $n = 30$ ;  $M = 33.67$ ;  $SD = 3,9$ ) fue significativamente superior ( $F_{1,53} = 8.58.4$ ;  $p < .01$ ), con un tamaño del efecto grande ( $d = 0.81$ ) (Cohen, 1988). La media del grupo 1 se situó en 38,33 años frente al grupo 2 que tenía una media de 34,12 años. Como se puede observar, la media del grupo 1 se situó por encima de 35 años.

En la **figura 4.17** se puede observar cómo el porcentaje de sujetos varones con feto afecto por mutaciones en el gen *FGFR3* aumenta especialmente a partir de los 35 años a pesar de la menor proporción de sujetos en esas edades. Es más, en nuestra muestra a estudio, el 26,5% de los sujetos del grupo 1 tenían una edad inferior a 35 años, mientras que el 73,5% tenía una edad igual o superior a 35 años.

**Figura 4.17: Relación entre el número de casos y proporción acumulada de positivos, según la edad**



A pesar de disponer de una serie no muy grande y estar sesgada sobre todo a población positiva, la edad aparece asociada a las mutaciones *FGFR3*.

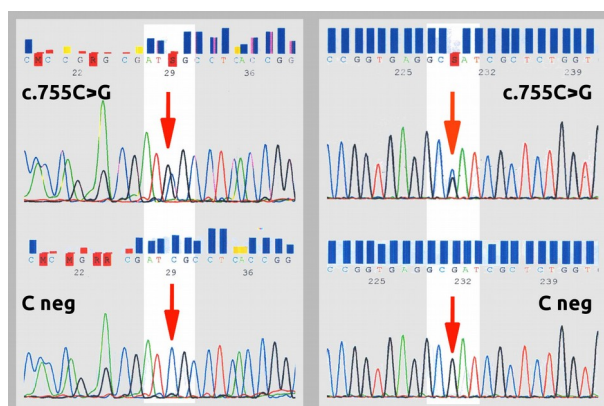
### 4.3.2. Gen *FGFR2*: síndrome de Apert y de Crouzon

#### 4.3.2.1. Resultados para el gen *FGFR2*

Se realizó el estudio del gen *FGFR2* a 3 casos y se obtuvo 1 resultado positivo:

- ACH-118: en un varón de 7 meses concebido por la técnica de reproducción asistida ICSI con óvulo de donante, intervenido de craneosinostosis y sospecha clínica de síndrome de Apert. El paciente presentaba la mutación c.755C>G; p.Ser252Trp (**figura 4.18**), publicada en 1995 por Park y por Wilkie (Park, 1995; Wilkie, 1995). El padre tenía 48 años en el momento de la concepción.

**Figura 4.18. Mutación c.755CA>G; p.Ser252Trp en un sentido y en el sentido contrario frente a control negativo**



Los 2 casos negativos (ACH-51 y AHC-332) venían para estudio del gen *FGFR3* con el fin de descartar la mutación p.Pro250Arg, típica del síndrome de Muenke y la más frecuente entre las craneosinostosis. Ante un resultado negativo, se decidió ampliar el estudio al resto de exones del gen *FGFR3* y a los exones 7 y 8 del gen *FGFR2*. Todos los resultados fueron negativos:

### 4.3.3. Gen *COMP*: pseudoacondroplasia

#### 4.3.3.1. Resultados para el gen *COMP*

El estudio del gen *COMP* se realizó a 5 casos en los que se solicitaba específicamente este gen y a 2 casos que presentaban una displasia ósea sin filiar. Para los 5 casos con solicitud de estudio de PSACH se realizó el estudio de los exones 10, 13 y 14, con 2 resultado positivos (40%):

- **ACH-156**: varón de 4 años que presentó un crecimiento normal hasta los 2 años a partir de la cual, disminuyó la velocidad de crecimiento significativamente. En la exploración presentaba una talla de -3,2SDS con macrocefalia, dolicocefalia, hiperlaxitud articular, *cubitus valgus* bilateral, manos pequeñas en tridente con dedos cortos y gruesos. El estudio radiológico a los 4 años apreciaba alteraciones en huesos largos con cortedad rizo-métrica y deformidad metafisaria en copa, vértebras biconvexas y aplanadas. En la **figura 4.19** se muestra el fenotipo presentado por el paciente. El diagnóstico clínico era de PSACH. En el estudio realizado se encontró la mutación c.1336G>A; p.Asp446Asn en heterocigosis en el exón 13 del gen *COMP* (**figura 4.20**), descrita como patogénica por Maddox (1997).

**Figura 4.19.** paciente de la familia ACH-156 a la edad de 4 años, cuando fue diagnosticado y a la edad de 15 mostrando la hiperflexibilidad característica de estos pacientes



- ACH-255: varón con solicitud de estudio de PSACH sin ninguna descripción clínica, que presentaba la mutación más frecuente c.1417\_1419del-GAC; p.Asp473del en heterocigosis en el exón 13 del gen *COMP* (**figura 4.20**), descrito por Hecht (1995).
- Entre los 3 casos negativos, 2 casos procedían de las muestras remitidas desde la República Dominicana con estudios realizados a partir de células bucales, de pacientes clínicamente bien definidos:
- ACH-64 sólo se pudo descartar mutaciones en el exón 13 por falta de muestra.
- ACH-79: el estudio de los tres exones resultó negativo.

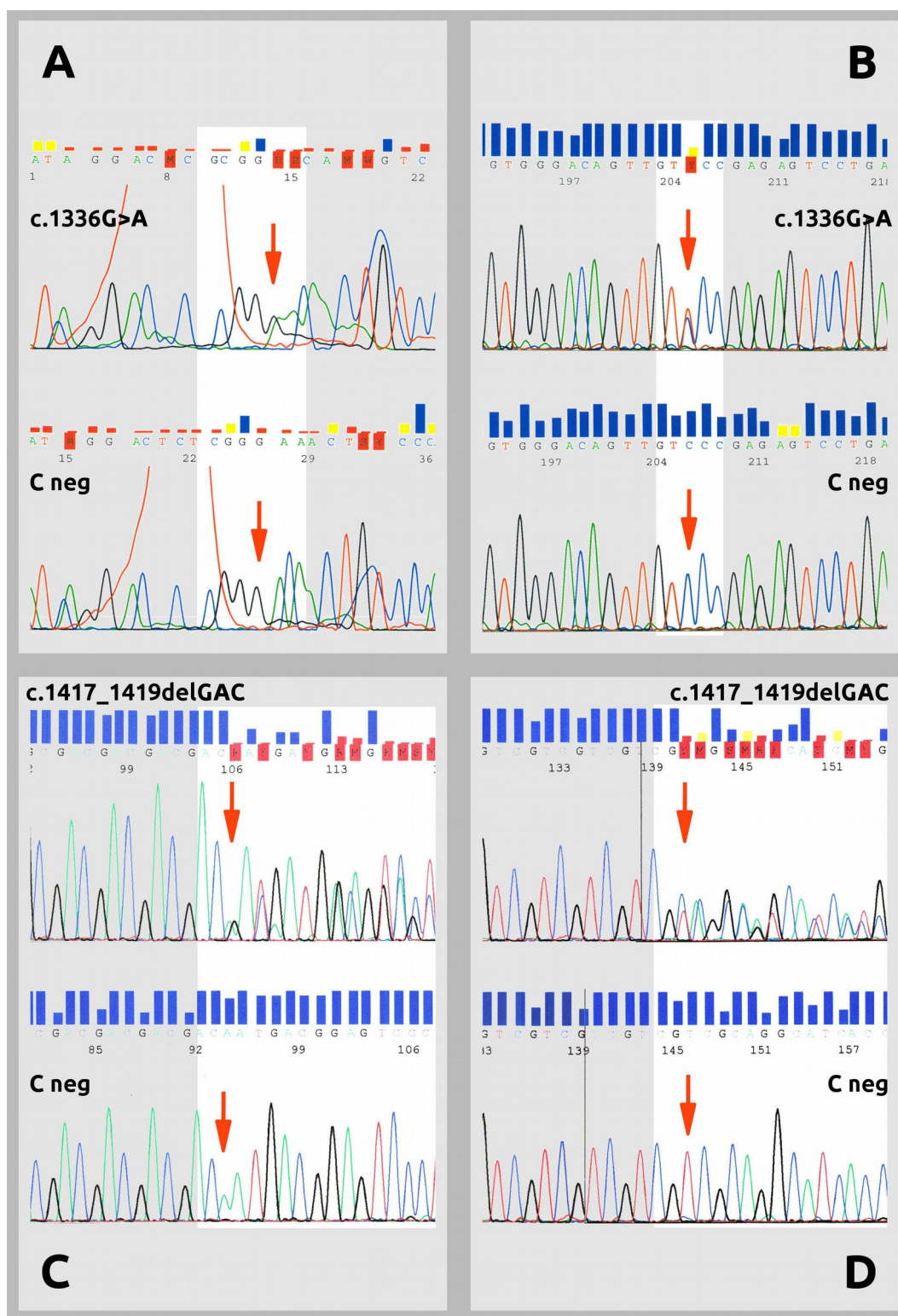
ACH-102: niño de Santo Domingo de 18 meses de edad con desproporción corporal y la solicitud de diagnóstico diferencial entre HCH e PSACH con un resultado negativo tanto en el gen *FGFR3* como en los 3 exones estudiados del gen *COMP*.

- Además de estas cinco familias, se amplió el estudio a dos familias más, ACH-119 y ACH-210, ambos casos en varones que no presentaban una clínica clara de PSACH:
- ACH-119 era un varón de 27 años con talla baja disarmónica y deseo de descendencia no afecta por lo que se amplió el estudio al gen *COMP*.

ACH-210: otro varón con diagnóstico de displasia metafisaria sin filiar.



Figura 4.20. Mutación c.1336G>A; p.Asp446Asn (parte superior) y control negativo (parte inferior), en un sentido (A) y en el sentido contrario (B). Mutación c.1417\_1419delGAC; p.Asp473-del (parte superior) y control negativo (parte inferior) en un sentido (C) y en el sentido contrario (D)



### 4.3.4. Gen *SLC26A2*: displasia epifisaria múltiples recesiva

#### 4.3.4.1. Resultados para el gen *SLC26A2*

Este epígrafe y su estudio en el laboratorio se desarrolló para una mutación familiar del caso ACH-228: mujer de 10 meses de edad que acude para una segunda opinión por información genética contradictoria: está diagnosticada de displasia diastrófica por mutación en homocigosis p.Arg279Trp en el gen *SLC26A2* siendo el padre portador en heterocigosis de esa mutación y la madre no portadora.

Durante la gestación, en la ecografía del segundo trimestre se observó acortamiento de miembros ( $P < 5\%$ ), con una translucencia nuchal aumentada ( $> 6\text{mm}$ ) y pie zambo derecho por lo que se recomendó la realización de una amniocentesis para descartar cromosopatías con resultado normal [46,XX]. En la ecografía de las 29 semanas persistía el acortamiento de miembros, con polihidramnios y disminución de perímetro torácico, por lo que se diagnosticó de acondrogénesis letal tipo 1b. Debido al acortamiento de miembros, se realizó estudio molecular mediante microarray para displasias óseas (CircaGen, USA) donde se encontró la mutación en homocigosis p.Arg279Trp en exón 3 del gen *SLC26A2*, por lo que se le diagnosticó de displasia diastrófica. Nació a las 38 semanas con 3070g (p50); 47cm (P10-25) y PC de 37cm (P75-90). Apgar 7/8. A la exploración en el nacimiento se observó duplicidad renal bilateral que no requería tratamiento, comunicación intraauricular con tendencia a la resolución, hipotonía generalizada, pie zambo derecho, micromelia y plagiocefalia discreta postural. Los estudios metabólicos y de imagen fueron normal. Alcanzó el sostén cefálico a los 5 meses de edad.

A la exploración en la consulta con 10 meses para segunda opinión, presentaba talla de 70 cm (P25-50) con peso de 7500g (P3-10) y PC 45 cm (P25-50). La braza medía 79cm y el segmento superior 46cm. La relación entre los segmentos superiores e inferiores era de 1,35. La relación talla sentado/talla era de 65%. La relación braza/talla era del 113% que demuestra el aparente acortamiento de brazos y muslos en relación a antebrazos y piernas. Persistía una discreta hipotonía global y la plagiocefalia con discreta deformidad craneal. El pie zambo derecho estaba corregido. La paciente aportó serie ósea en la que se observaba plagiocefalia, cuenca de ojos alargados, escoliosis dorsolumbar, rizomelia en miembros superiores, disminución del ángulo carpiano y disminución del peroné (**Figura 4.21**). Con esta edad era capaz de mantenerse sentada.

Esta familia venía para una segunda opinión ya que el estudio prenatal, que incluía a los progenitores, indicaba que el feto presentaba la mutación en homocigosis c.835C>T; p.Arg279Trp, el padre era portador pero la madre no presentaba la mutación. A la madre se le indicó que podía ser portadora de una delección completa del gen.

**Figura 4.21. Probandus de la familia ACH-228. La primera foto tomada a los 10 días de vida. Las radiografías y el resto de fotos tomadas a los 10 meses de vida.**



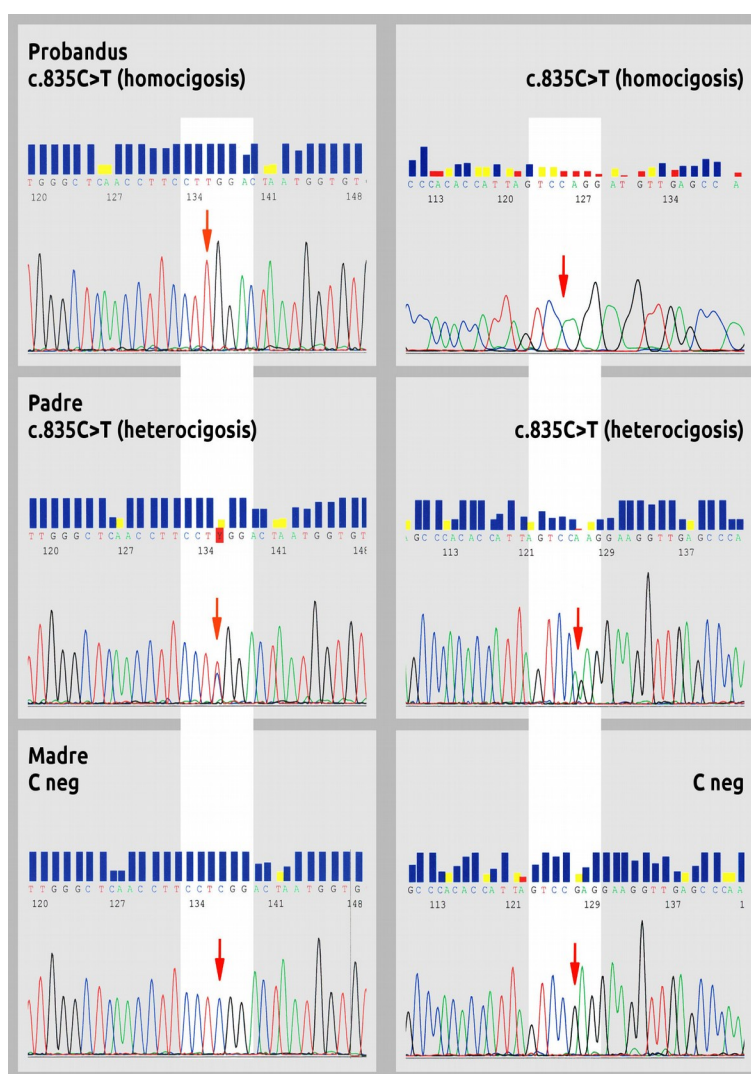
Se plantean cuatro posibles hipótesis *a priori* que podrían explicar el resultado de la madre:

1. Deleción completa del alelo materno,
2. Fallo en la amplificación de la muestra materna por polimorfismos en la secuencia de los cebadores,
3. Mutación *de novo* en la paciente en el alelo materno,
4. Disomía paterna.



Para dilucidar las distintas posibilidades se realizaron distintas técnicas de laboratorio: primero se diseñó y amplificó mediante técnica de Sanger la mutación c.835C>T [p.Arg279Trp] en tres nuevas muestras extraídas de cada uno de ellos. El resultado fue de homocigosidad en la paciente, heterocigosidad en el padre y ausencia de la mutación en la madre (*figura 4.22*).

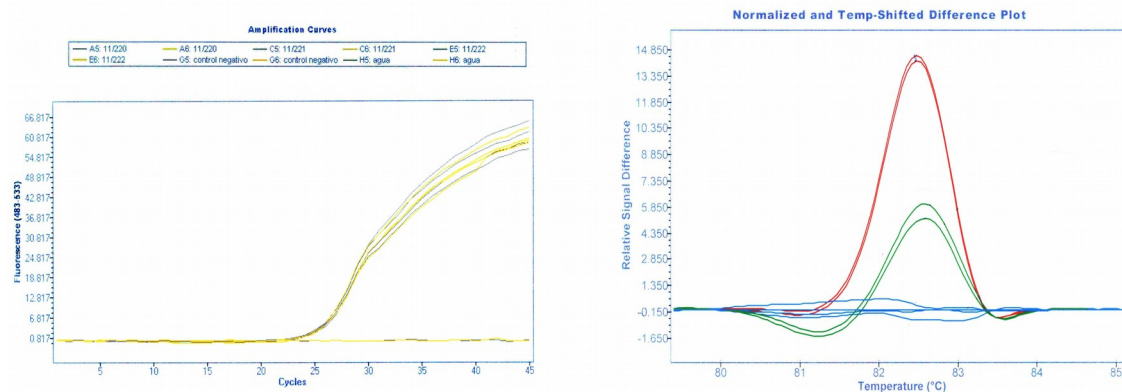
**Figura 4.22. Mutación c.835C>T; p.Arg279Trp en homocigosidad (parte superior), en heterocigosidad (parte media) y control negativo (parte inferior) en un sentido (columna izquierda) y en el sentido contrario (columna derecha)**



Este estudio descartó la presencia de polimorfismos en la secuencia de los cebadores ya que el diseño realizado fue exclusivo para la paciente y se desconocían los reactivos utilizados por el otro laboratorio. Para el diseño se tuvo especial cuidado de elegir una secuencia para los cebadores que no incluyese regiones que pudieran dar amplificaciones sesgadas por la presencia de estos polimorfismos.

Para el estudio de la posible presencia de una delección completa o parcial del gen en el alelo materno, se realizó una PCR a tiempo real amplificando el exón 3 del gen *SLC26A2* que se analizó por alta resolución de fusión. Como se observa en la **figura 4.23**, no había retraso en la aparición de las curvas por lo que la cantidad de amplificado era la misma en todos los casos, es decir, no había una delección del alelo materno, lo que descarta la presencia de la delección tanto en la madre (portadora) como en la paciente. Además se pudo observar que existían tres patrones distintos ya que existían 3 temperaturas de desnaturalización distintas, como se observaba en la secuenciación Sanger (**figura 4.23**).

**Figura 4.23. PCR a tiempo real de la amplificación del exón 3. A la izquierda se observa que las curvas de amplificación se inician a la vez y a la derecha que hay tres patrones de amplificación**

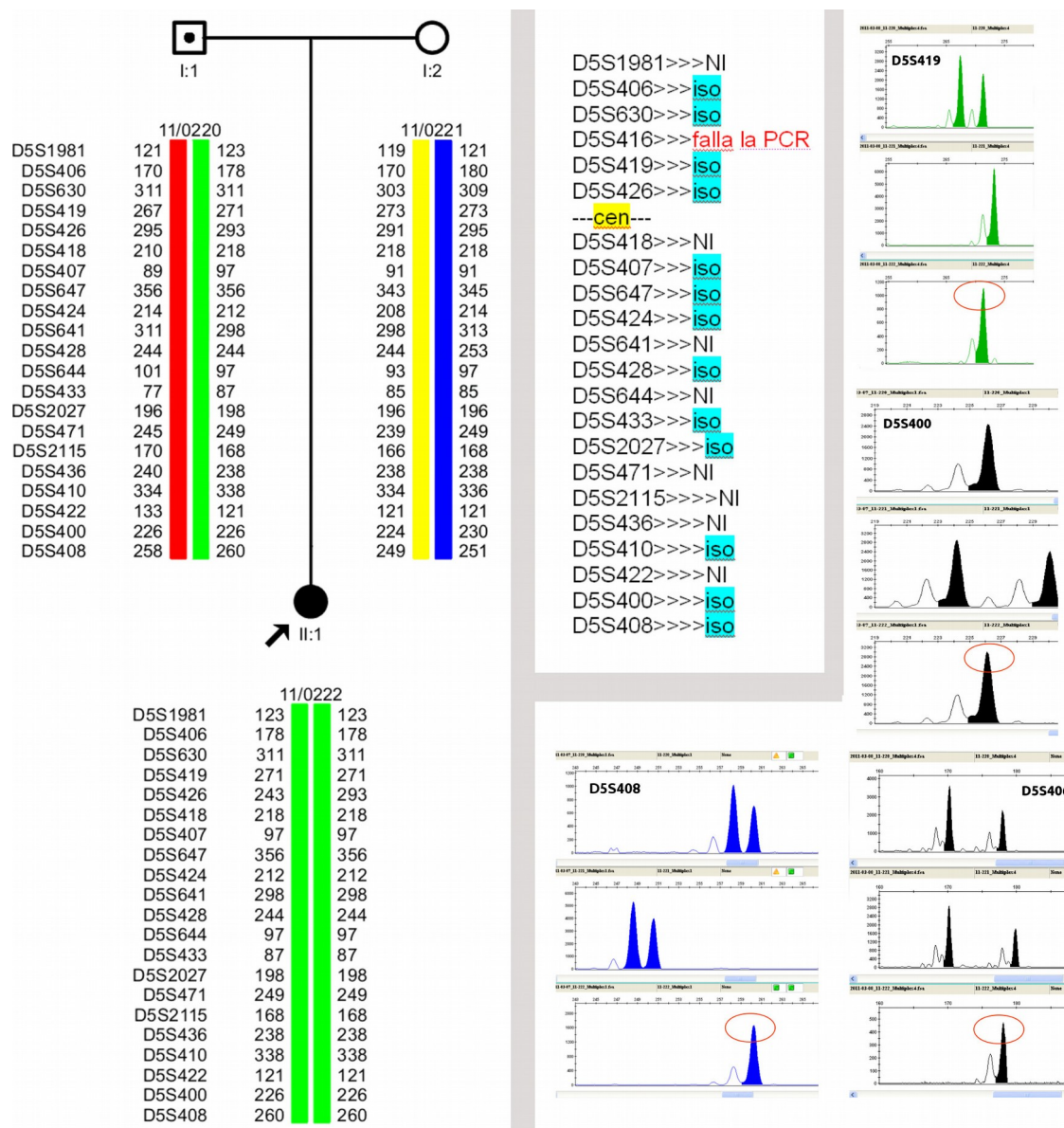


Con estas dos técnicas se descartaban tanto la delección del alelo materno como el fallo de amplificación. Para comprobar si era una mutación *de novo* o una isodisomía paterna, se realizó una análisis de haplotipos con 21 marcadores STRs a lo largo del cromosoma 5, de modo que, si había heredado un alelo de cada progenitor, sólo podría explicarse por una mutación *de novo* en el alelo materno de la paciente, pero si no heredaba ningún alelo materno habría que pensar en una disomía uniparental, más concretamente una isodisomía paterna.

El estudio indirecto de microsatélites puso de manifiesto la presencia de uno de los alelos paternos en la paciente duplicado, es decir, una isodisomía paterna completa, lo cual descartaba la presencia de una mutación *de novo* en el alelo materno y explica por qué la madre presentaba un patrón normal (**figura 4.24**).

Por lo tanto, el diagnóstico molecular de la paciente era de homocigosidad en la mutación c.835C>T; p.Arg279Trp en el exón 3 del gen *SLC26A2* por isodisomía completa paterna del cromosoma 5, lo que sugiere un diagnóstico clínico de displasia epifisaria múltiple recesiva o tipo 4, que es la clínica asociada a esta mutación descrita en homocigosidad (Superti-Fuga, 1999; García, 2014).

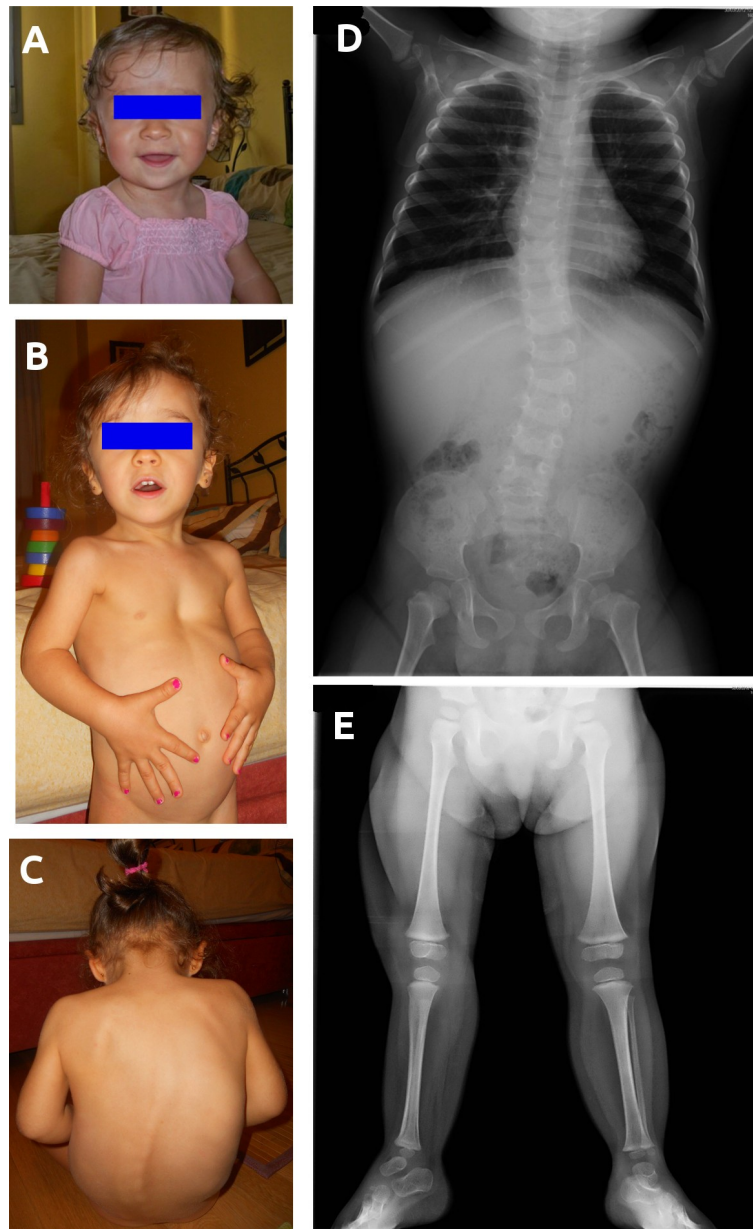
**Figura 4.24. Árbol geneológico de la familia ACH-228 con los resultados de los microsatélites realizados y ejemplos de electroferogramas de cuatro de ellos (secuencia padre-madre-hija)**



El seguimiento clínico realizado a la paciente a los 15 meses de vida mostró persistencia de la hipotonía y un retraso motor leve: sedestación completa a los 15 meses y bipedestación a los 19. A los 20 meses de edad, presentaba una talla P10-25, disminuida frente a la anterior; una talla sentado/talla del 61%, lo que indicaba un acortamiento del tronco; una relación braza/talla disminuida al 85% que también indica un acortamiento de extremidades. A la exploración se observaba acortamiento de las extremidades con predominio rizomélico, plagiocefalia occipital, hiperlaxitud del primer dedo de la mano derecha. Se observó y se

midió por radiografía una escoliosis combinada dorsal derecha D5-D11 de 22° y dorso lumbar izquierda D10-L4 de 20° (**figura 4.25**).

**Figura 4.25.** Probandus con dos años (A) y con tres años (B y C). Serie ósea de la probandus con dos años (D y E)



En la última evaluación a los 5 años y 3 meses realizada en junio de 2015, la paciente presentaba una talla en el P3-10 con el corse que utiliza para corregir la escoliosis. En la ecografía cardiaca persistía la comunicación intraauricular con tendencia a la resolución. La ecografía abdominal indicó un diagnóstico de morfología de doble sistema excretor *versus* hipertrofia de columna de Bertin bilateral (que es una variante anatómica normal) por lo que se le da de alta en ne-



frología pediátrica. El desarrollo psicomotor era de franca mejoría con evolución satisfactoria, cursaba 2º de infantil y requería necesidades educativas especiales en áreas específicas con un avance progresivo.

### 4.3.5 Gen *RMRP*: hipoplasia de pelo-cartílago.

#### 4.3.5.1. Resultados para el gen *RMRP*

Se estudiaron 2 casos con diagnóstico clínico de esta patología en los que se solicitó confirmación molecular, en el caso ACH-128 para asesoramiento genético reproductivo y en el caso ACH-358, para cofirmación diagnóstica. Los 2 casos resultaron positivos y se pudo caracterizar las mutaciones responsables de la enfermedad en el *probandus* y sus familiares directos:

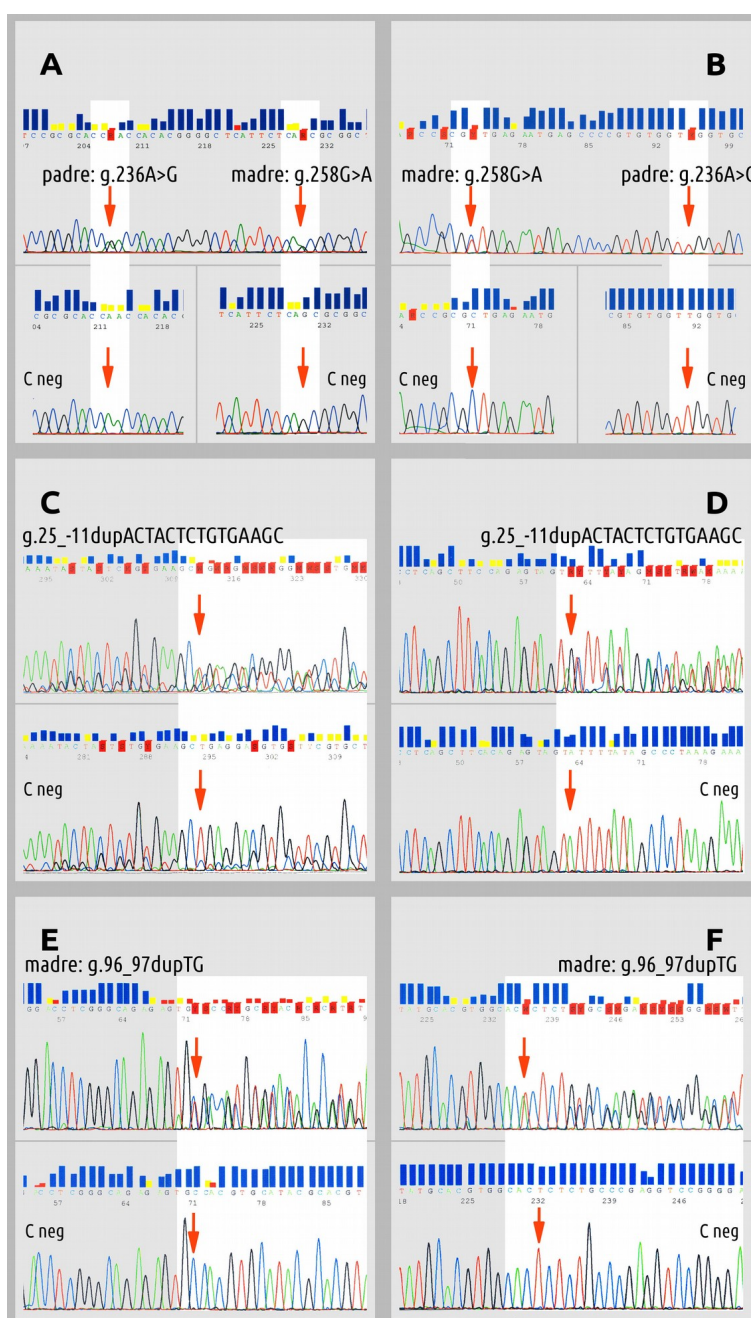
- ACH-128: varón de 3 años en seguimiento en la consulta de Pediatría del Dr. González Meneses, Unidad de Dismorfología, Servicio de Pediatría, Hospital Virgen del Rocío (Sevilla) desde los 7 meses de edad por presentar talla de 65,5 cm (-1.21SDS) y peso de 7850g (-0.72SDS). Era el único hijo de padres sanos no consanguíneos, sin otros antecedentes familiares de interés y sin afectación de displasia ósea. El parto fue eutócico a las 40 semanas con 3200g y 45 cm y PC de 36cm. Ingresó a los 4 meses en el hospital por gastroenteritis aguda. En la exploración era llamativo el pelo ralo, escaso y frágil con acortamiento de extremidades inferiores con fémures algo incurvados en varo y manos con dedos cortos pero no en tridente. Se realizó estudio óseo que puso de manifiesto una afectación ósea metafisaria con acortamiento de los huesos largos y ensanchamiento metafisario. Con estos datos se le diagnosticó de osteondrodisplasia tipo McKusick o hipoplasia de pelo-cartílago (**Figura 4.26**).

**Figura 4.26.** Foto del paciente de la familia ACH-128 donde se observa el pelo ralo y escaso con 9 meses, 18 meses, con 5 y con 7 años



El estudio inmunitario puso de manifiesto leucopenia a expensas de neutropenia moderada y linfopenia con disminución de linfocitos T CD4 y B+, siendo el resto del estudio de subpoblaciones linfocitarias normal. Presentaba niveles disminuidos de IgA siendo normales los de IgM e IgG. Los progenitores solicitan estudio molecular con el deseo de tener descendencia no afecta.

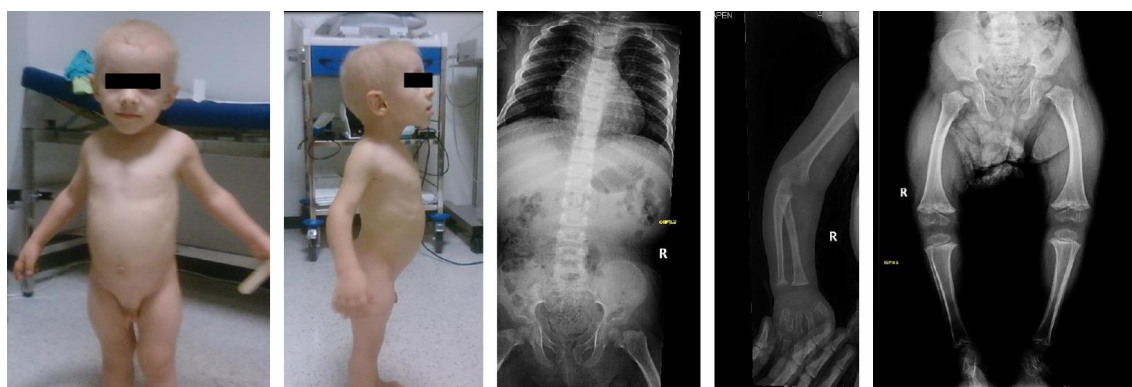
El estudio realizado puso de manifiesto que presentaba una doble mutación en heterocigosis: g.236A>G descrito por Rindapää (2002), de origen paterno, y g.258G>A, de origen materno no descrito en la bibliografía (Fenollar-Cortés, 2015; **figura 4.27 A y B**).



**Figura 4.27. ACH-128: mutación g.236A>G y g.258G>A comparado con control en un sentido (A) y en el sentido contrario (B). ACH-158: mutación g.25\_-11dupACTACTCTGTGAAGC comparado con control en un sentido (C) y en el sentido contrario (D). Mutación g.96\_97dupTG comparado con control en un sentido (E) y en el contrario (F)**

- ACH-358:** se remite muestra de sangre periférica para estudio del gen *RMRP* de un paciente de 2 años y 3 meses remitido por el servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Infanta Cristina, Dra Lara Oreja. Embarazo fruto de padres no consanguíneos de origen rumano controlado en su país, parto a término, se desconocen los datos antropométricos. Es ingresado para estudio a la semana de vida y diagnosticado de ACH. No ha requerido otros ingresos. En la exploración a los 2,3 años presentaba una longitud de 62cm (-9,6SDS), y un peso de 8620gr (-3,34SDS), con acortamiento de extremidades superiores e inferiores, con manos toscas y dedos cortos. No presentaba deformidad craneal pero sí escasa cantidad de pelo, muy fino y rubio (**Figura 4.28**). El estudio radiológico se describió como normal. Una re-evaluación más tarde por parte del Dr. Ignacio Pastor (radiólogo infantil) describió: edad ósea de menos de 3 meses en mano con metáfisis en copa, huesos de las manos cortos; incurvación de fémures con retraso en la osificación de la epífisis femoral proximal, metáfisis de las rodillas anchas con irregularidades que empiezan a aparecer como quistes con epífisis poco osificadas, cavidades glenoideas sin configurar, costillas algo cortas y vértebras que parecen planas, características radiológicas compatibles con la osteocondrodisplasia tipo McKusick. (**Figura 4.28**). Dadas las características clínicas del paciente se solicita estudio del gen *RMRP*.

**Figura 4.28.: paciente del caso ACH-358 con 4,5 años de edad e imágenes radiológicas con 2 años**



El estudio molecular puso de manifiesto la presencia de una doble mutación en heterocigosis: g.25\_-11dupACTACTCTGTGAAGC, descrita por Muñoz-Robles (2006), y g.96\_97dupTG por Rindapää (2001), de origen materno (**figura 4.27, C, D, E y F**). La primera mutación descrita en el pa-

ciente se sospecha del padre aunque éste no mantiene relación con la familia y, por tanto, no se ha podido comprobar.

En ambos casos, se ha conseguido la evolución clínica de los pacientes:

- ACH-128: hasta los 9 años que presenta en la actualidad ha continuado con talla baja (actualmente 108cm, [-4,06SDS] con peso de 20 kg [-2,25SDS]), con incurvamiento en *varo* de las extremidades de forma moderada con seguimiento en rehabilitación. Persiste el pelo ralo sin otras alteraciones relevantes. Ha presentado dos neumonías sin identificación de gérmenes sin otras infecciones de repetición, invasivas y oportunistas. Está correctamente vacunado según el calendario de su comunidad (difteria, tétanos, tosferina, meningococo C, virus hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo B, sarampión, rubeola y parotiditis). Recibe periódicamente la vacuna del neumococo polisacárida. Con las vacunas de virus vivos atenuados ha presentado reacciones febriles leves que no han requerido interrupción ni ingresos hospitalarios específicos. Ha conseguido inmunidad para todas las vacunas administradas. Toma trimetoprim sulfametoxazol de manera profiláctica tres días por semana.

Ante el deseo de descendencia no afecta, gracias al diagnóstico molecular confirmatorio, se pudo realizar dos diagnósticos prenatales no invasivos e invasivos en dos gestaciones consecutivas ya descritas en el apartado 4.2.2.

- ACH-358: durante las revisiones periódicas, ha presentado una velocidad de crecimiento de entre 4 y 7cm al año (-2,1SDS y -1,4SDS), sin padecer en ningún momento ninguna infección grave ni cuadro de malabsorción intestinal. Actualmente tiene 7,4 años y una talla de 90.6cm (-6.2SDS).

#### 4.3.6. Gen *SHOX*: discondreosteosis de Léri-Weill, displasia mesomélica de Langer y talla baja idiopática

##### 4.3.6.1. Resultados positivos del gen *SHOX*

De los 173 *probandi* iniciales, se identificaron mutaciones en el gen *SHOX* o la región PAR1 adyacente, en 15 de ellos lo que constituye el 8,7% de los casos.

En la **tabla 4.10** se muestran las características clínicas y genéticas que presentaron estos 15 pacientes con alteraciones en el gen *SHOX* así como los diagnósticos finales.



Tabla 4.10. Características generales de los pacientes con alteración en el gen *SHOX*

FAMILIA	INDICACIÓN CLÍNICA	EDAD SEXO	TALLA (SDS)	TIPO	TALLA GENÉTICA	MADEJUNG	CLÍNICA	ALTERACIÓN <i>SHOX</i>	GRUPO	DIAGNÓSTICO	ANTECEDENTES FAMILIARES
ACH-13	ACH o Tanatóforo	31 sem/♂	DND	disarmónico	DND	no	Prematuro de 31 semanas. CIR severo. Fémur corto o incurvados sin fracturas, Cráneo poco osificado.	Hemi/homocigosis de región reguladora	FGFR3	Desconocido	otro feto fallecido con igual signos
ACH-28	ACH y HCH	4 sem/♂	DND	disarmónico	DND	DND	DND	Deleción heterocigota gen <i>SHOX</i>	FGFR3	Discondrosteosis de Léri-Weill	DND
ACH-81	HCH	31 a/♀	DND	disarmónico	DND	DND	DND	Duplicación gen <i>SHOX</i>	FGFR3	Discondrosteosis de Léri-Weill	DND
ACH-109	Nieta afectada de deformidad de Madelung	72 a/♂	158 (-3,1SDS)	DND	DND	DND	DND	Deleción heterocigota gen <i>SHOX</i>	OTROS	Talla baja por haploinsuficiencia del <i>SHOX</i>	Nieta con deformidad de Madelung
ACH-112	HCH	12 a	-3,82	disarmónico	153,5 (-1,44SDS)	DND	DND	Deleción heterocigota gen <i>SHOX</i>	FGFR3	Discondrosteosis de Léri-Weill	No consta
ACH-162	Deformidad de Madelung	29 a/♀	157 (-0,79SDS)	armónico	157 (-0,79SDS)	sí	Sin interés	Deleción heterocigota gen <i>SHOX</i>	OTROS	Discondrosteosis de Léri-Weill	Padre, tío paterno y primo paterno
Varios-517	Retraso mental	6 a/♀	DND	armónico	DND	no	Higroma quístico con resolución espontánea. Hernia diafragmática congénita y brida amniótica. Parada cardiorrespiratoria. Retraso mental. Hipoplasia del cuerpo callos con dilatación ventricular y retraso en la mielinización	Duplicación gen <i>SHOX</i>	OTROS	Síndrome polimalformativo	Padre sin clínica
ACH-138	TBI	12 a/♀	-2,62	armónico	154,2 (-1,1SDS)	no	Hipertrofia de pantorrillas, IMC-P50	Deleción heterocigota región reguladora	RAPPOLD	Talla baja por haploinsuficiencia del <i>SHOX</i>	Padre y abuela paterna
ACH-261	TBI	8 a/♀	-3	armónico	154,5 (-1,26SDS)	no	CIR. Edad ósea retrasada 2 años. Relación brazo/talla <96,5% e incurvación del antebrazo	Deleción heterocigota región reguladora	RAPPOLD	Talla baja por haploinsuficiencia del <i>SHOX</i>	Madre, 2 tías maternales y abuelo materno
ACH-307	Displasia mesomélica de Langer	3 ma/♀	47,5	disarmónico	154 (-1,35SDS)	sí	Micromelia rizomelia y mesomelia. Consanguinidad.	c.[508C>G;508C>G];p.[Ala170Pro;Ala170Pro]	OTROS	Displasia mesomélica de Langer.	Tío afecto DL
ACH-338	TBI	2 a/♂	-1,66	armónico	166,25 (-1,63SDS)	no	ICSI. Incurvación del radio	Deleción heterocigota región reguladora	IE	Talla baja por haploinsuficiencia del <i>SHOX</i>	Padre
ACH-339	TBI	9 a/♀	-1,31	armónico	162,5 (-0,23SDS)	no	CIR. Dismorfia. Relación talla sentado/talla>55,5.	Deleción heterocigota región reguladora	RAPPOLD	Talla baja por haploinsuficiencia del <i>SHOX</i>	Madre
HCSC-10	Displasia esquelética	10 a/♀	-3,43	disarmónico	164 (0,42SDS)	sí	Madre tuvo tto con HC	Deleción heterocigota exón 3 gen <i>SHOX</i>	HCSC	Discondrosteosis de Léri-Weill	De novo
HCSC-17	TBI	8 a/♀		armónico	152 (-1,72SDS)	no	Gran pretérmino de 24 semanas. Trastorno del aprendizaje. Padre sordo secundario a tto antibiótico. AF de talla baja materna.	Deleción heterocigota región reguladora	HCSC	Talla baja por haploinsuficiencia del <i>SHOX</i>	Padre, madre y hermano
HCSC-18	TBI	13 a/♂		armónico		no	IMC-P50	Duplicación gen <i>SHOX</i>	HCSC	Talla baja por haploinsuficiencia del <i>SHOX</i>	Padre

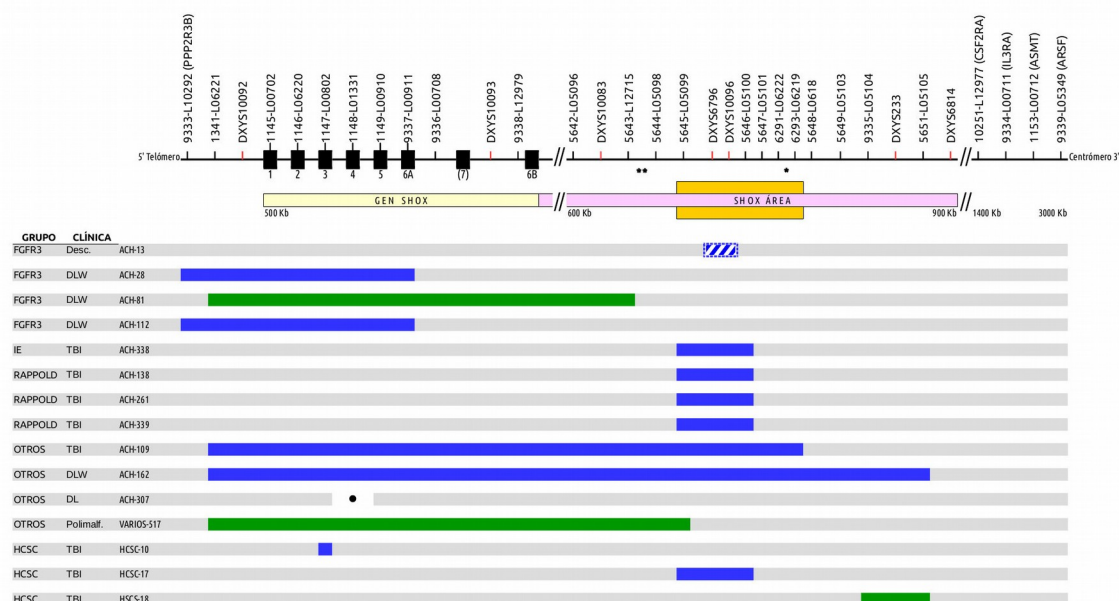
CIR: Crecimiento intrauterino retardado. DL: Displasia mesomélica de Langer. DND: Dato no disponible. HC: Hormona de crecimiento. IMC: Índice de masa corporal. Tto: Tratamiento

En la **figura 4.29** se pueden observar estas alteraciones encontradas:

- 11 casos (73,3%) presentaron deleción en el gen *SHOX* y/o de la región PAR1 adyacente:
  - 2 casos con la deleción completa del gen *SHOX* y parte de la región 3' adyacente
  - 2 casos con deleción de la región 5' previa y una deleción parcial del gen *SHOX*
  - 6 casos con la deleción de dos sondas que se encuentra en la región putativa reguladora en la región 3' del PAR1
  - 1 deleción parcial del exón 3.
- 3 casos (21,4%) presentaron duplicación:
  - 2 duplicaciones grandes que implicaban todo el gen *SHOX* y parte de la región 3' adyacente
  - 1 pequeña duplicación de dos sondas en la región 3' pero fuera de la zona reguladora

- 1 caso (7,2%) presentaba una mutación en homocigosis, c.508G>C; p.Ala170-Pro, que indicó la afectación de una displasia mesomélica de tipo Langer.

**Figura 4.29. Alteraciones encontradas en los 15 pacientes. Se marcan con línea negra las sondas del MLPA P018-D1. Con línea roja la localización de los microsatélites. Los cuadrados negros representan los exones del gen. El rectángulo naranja señala la región putativa reguladora. El asterisco señala las 3 secuencias no codificantes evolutivamente conservadas (CNE: conserved non-coding DNA elements). Las deleciones se representan en azul. Las duplicaciones en verde. El punto negro representa la mutación puntual y el recuadro azul discontinuo la alteración encontrada mediante microsatélites. No mantiene una escala real**



A pesar del número bajo de pacientes positivos, podemos realizar el análisis de la clínica presentada por los 7 pacientes con diagnóstico de TB por haploinsuficiencia del *SHOX* y los 5 afectados de DLW, aunque en este último grupo carecemos de mucho datos. El número de mujeres afectas en nuestra serie es el doble que de hombres. En la **tabla 4.11** se muestran los resultados.

**Tabla 4.11. Clínica presentada por los afectados de TB por haploinsuficiencia del *SHOX* y por los afectados de DLW.**

		TALLA <2SDS	DISARMÓNICO	DEFORMIDAD DE MADELUNG	CIR	AF*	ALTERACIÓN SHOX
TB por haploinsuficiencia del <i>SHOX</i>	ACH-109	sí	no	no	no	DND	Deleción
	ACH-138	sí	no	no	no	sí	Deleción
	ACH-261	sí	no	no/incurvación	sí	sí	Deleción
	ACH-338	no	no	no	no	sí	Deleción
	ACH-339	no	no	no	sí	no	Deleción
	HCSC-17	sí	no	no	no	sí	Deleción
	HCSC-18	sí	dudoso	no	no	sí	Duplicación
DLW	ACH-28	DND	sí	DND	DND	sí	Deleción
	ACH-81	DND	sí	DND	DND	DND	Duplicación
	ACH-112	sí	DND	DND	DND	no	Deleción
	ACH-162	no	no	sí	no	sí	Deleción
	HCSC-10	sí	sí	sí	no	no	Deleción

\*como AF se considera la presencia de un familiar directo que tenga la clínica del *probandus*, no que tenga la alteración en el gen *SHOX*.

En nuestras series de pacientes afectados de TB por haploinsuficiencia del *SHOX*, no existe ningún criterio que se encuentre en el 100% de los pacientes. Por orden de frecuencia las características de nuestra serie serían:

1. 83,3% presentan un antecedente familiar con talla baja inferior a 2SDS.
2. 71,4% presentan una talla inferior a 2SDS.
3. 28,6% presentó CIR en el periodo prenatal.
4. 14,3% presenta un fenotipo armónico y ausencia de deformidad e incluso de incurvación del antebrazo

Para el grupo de DLW, además de ser una serie pequeña con sólo 5 casos, tenemos muy pocos datos completos: sólo 2 de 5 pacientes. Sin embargo, la DLW está bien definida en su expresión clínica: presenta talla baja disarmónica o deformidad de Madelung o ambas. En la serie presentada de 5 pacientes con afectación de DLW cumplen alguna de estas características.

Dada la heterogeneidad en la selección de los pacientes, para proceder a su análisis, se dividieron en 5 grupo en función de su origen:

#### 4.3.6.1.1. Grupo FGFR3

Este grupo lo constituyen pacientes remitidos para estudio del gen *FGFR3* por presentar, al menos, talla baja y disarmonía. Ante el estudio negativo y nuevo consentimiento, se realizó estudio del gen *SHOX*. De las 30 familias de este grupo, 3 presentaban alteración en el gen *SHOX* (10%) y 1 familia presentaba una probable delección de la región reguladora (total 4 casos 13,3%) (**figura 4.29**). Los 3 primeros casos pertenecen al primer periodo de 1988 al 2006 :

- ACH-13: una probable delección de la región promotora en 3' del PAR1 por hemi/homocigosidad de los marcadores DXY10096 y DXY6796.
- ACH-28: una delección heterocigota desde la sonda 9333-L10292 en el gen *PPP2R3B* (región 5' del gen) hasta la sonda 9337-L0091 situada en el exón 6A del gen *SHOX*.
- ACH-81: una duplicación de todo el gen *SHOX* desde la sonda 1341-L06221, a 4,7kb del gen, hasta la sonda 5643-L12715 situado en la región 3'.
- ACH-112: una delección heterocigota igual que la encontrada en el caso ACH-28.

No se pudo estudiar a los progenitores en ninguno de los 4 casos. Adicionalmente, un paciente era afecto de raquitismo hipofosfatémico ligado al cromosoma X (ACH-186).

En la **tabla 4.12** se muestran las características de estos 30 casos.

**Tabla 4.12. Características de los pacientes del grupo FGFR3. DND: dato no disponible**

FAMILIA	EDAD	INDICACIÓN CLÍNICA	CARIOTIPO	TALLA (SDS)	TALLA GENÉTICA	TÉCNICA REALIZADAS PARA EL GEN SHOX			RESULTADO SHOX	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO
						STRs	MLPA	SECUENCIACIÓN			
ACH-8	4 m	DO	46,XY	-2,57	DND	✓			Negativo	En el embarazo se detecta fémur corto en el 3TM. Al nacimiento RX que descarta ACH. Leve acortamiento de EESS e II	Desconocido
ACH-13	31 sem	ACH o Tanatóforo	46,XY	DND	DND	✓			Hemi/Homocigosidad DXYS10096+DXYS6796	Varón prematuro de 31 semanas, CIR severo, fémur corto o incurvados sin fracturas, desproporción entre cráneo y el cuerpo y entre el segmento superior y el inferior. Cráneo poco osificado. Antecedentes de otro feto fallecido con iguales signos.	Probable alteración gen SHOX
ACH-14	3 a	ACH	46,XX	DND	DND	✓			Negativo	Talla baja, retraso psicomotor y del lenguaje leve, dermatitis atópica, defecto óseo a nivel frontal, hipoacusia del oído izquierdo y mano en tridente.	Probable sd cromosómico
ACH-18	6 m	ACH	46,XX	-4,53	DND	✓	✓		Negativo	Al nacimiento, pretérmino 35 semanas y 860g, CIR severo. Asfixia neonatal leve. Con 6 meses megacefalia y talla baja con acortamiento de extremidades. Manos cortas con aspecto en tridentes. El mapa óseo presenta acortamiento de extremidades y no alteraciones en vértebras.	Desconocido
ACH-26	5 a	HCH	46,XY	-2,3	170,1 (-0,18SDS)	✓			Negativo	En embarazo a las 32 sem se detecta fémur corto. Al nacimiento talla baja (<P3) y miembros cortos. Con 5 años: Braquicefalia. Micrognatia, cuello corto, tórax en quilla, leve cortidad rizomélica. RX: platiespondilia lumbar con palas ilíacas algo más cortas, marcada disminución y deformidad de cabezas femorales y humerales, así como acetábulo.	¿Displasia espondiloeipifisaria?
ACH-27	11 a	HCH	46,XX	-2,5	DND	✓			Negativo	Consanguineidad. Talla baja y rizomelia como el padre y abuela paterna.	Displasias rizomélicas y epifisarias
ACH-28	4 sem	ACH y HCH	46,XY	DND	DND	✓	✓		Deleción heterocigota	DND	Alteración SHOX
ACH-36	14 a	HCH	46,XY	DND	DND	✓	✓		Negativo	Hiperlordosis, acortamiento rizomélico de extremidades, no macrocefalia.	Desconocido
ACH-45	37 a	ACH y HCH	46,XY	DND	DND	✓			Negativo	Armónica. Antecedente de feto con DO+monosomía 21	Desconocido
ACH-50	1 sem	ACH y HCH	46,XX	DND	DND	✓			Negativo	DND	Desconocido
ACH-53	DND	ACH	46,XY	DND	DND	✓	✓		Negativo	DND	Desconocido
ACH-59	Adulto	HCH	46,XX	-4,88	DND	✓	✓	✓	Negativo	Desproporcionada, no alteraciones faciales, antecedentes paternos.	Desconocido
ACH-64	2 a	PSACH	46,XY	DND	DND	✓	✓		Negativo	Hermano afecto fallecido	¿Pseudocondroplasia? Homocigosidad en los 5 marcadores STRs utilizados
ACH-78	36 a	ACH	46,XX	DND	DND	✓			Negativo	De novo. Se pide ACH para diagnóstico diferencial	Displasia espondiloeipifisaria vs Sd Kniest
ACH-79	12 a	PSACH	46,XX	DND	DND	✓			Negativo	DND	¿Pseudocondroplasia?
ACH-81	31 a	HCH	46,XX	DND	DND	✓	✓		Duplicación	DND	Alteración SHOX
ACH-84	9 a	ACH y HCH	46,XX	DND	DND	✓	✓	✓	Negativo	DND	Desconocido
ACH-102	18 m	HCH/PSACH	46,XY	DND	DND	✓	✓		Negativo	Metáfisis anchas y puntiagudas fémur y tibias. Diáfisis de huesos anchas. Cúbitos ligeramente acortados. Peroné elongado.	¿Pseudocondroplasia?
ACH-103	2 a	DO	46,XY	DND	DND	✓	✓		Negativo	Pelvis pequeña, acortamiento asimétrico de MMII, ensanchamiento de metáfisis, metáfisis en V del fémur distal	¿Sd Dyggve-Melchior-Clausen?
ACH-112	12 a	HCH	46,XX	-3,82	153,5 (-1,44SDS)	✓	✓		Deleción heterocigota	DND	Alteración SHOX
ACH-119	27 a	DO	46,XY	DND	DND	✓	✓		Negativo	Acortamiento MMSS	Desconocido
ACH-145	1 a	HCH	46,XY	DND	DND	✓	✓		Negativo	Eco prenatal: rizomelia de EESS e II. Madre en centro de acogida.	Desconocido
ACH-159	3 a	HCH	46,XY	DND	DND		✓	✓	Negativo	Talla baja, acortamiento EE y macrocefalia. Serie ósea: ausencia de ensanchamiento vertebral.	Desconocido
ACH-182	1 m	ACH	46,XY	DND	DND		✓		Negativo	Prenatal: polihidramnios. Al nacimiento: 3500g y talla 51 cm con PC 38cm. Al mes frente olímpica, puente nasal deprimido, filtrum corto y paladar ojival. MMSS algo acortados y no proporcionados respecto al tórax-abdomen	Desconocido
ACH-186	3 a	HCH	46,XY	DND	DND		✓	✓	Negativo	Fenotipo de HCH	Raquitismo o hipofosfatémico ligado al X
ACH-210	35 a	Displasia metafisaria	46,XY	DND	DND		✓		Negativo	Diagnóstico desde los 4 años de displasia metafisaria, portador de muleta desde los 13 años.	¿Sd Kniest?
ACH-242	1 m	Micromelia prenatal	46,XX	DND	DND		✓		Negativo	Micromelia prenatal	Normal
ACH-279	30 a	HCH	46,XX	-3,22	155 (-1,16SDS)		✓	✓	Negativo	Hiperlordosis, desproporción de MMSS, falanges y metacarpiños cortos, rotación interna de rodillas. AF de talla baja por rama materna sin desproporción.	¿Sd de Stickler?
ACH-311	10 a	HCH	46,XY	DND	DND		✓		Negativo	Talla baja y mesomelia. Serie ósea: ausencia de aumento de distancia interpeduncular lumbar y edad ósea retrasada.	Desconocido
ACH-331	4 a	HCH	46,XX	DND	DND		✓		Negativo	Talla baja, micromelia con rizomelia, braquidactilia. Se parece a la madre.	Desconocido

Pocos datos clínicos tenemos de estos pacientes con alteraciones en el gen *SHOX*. Sólo tenemos la clínica de la familia ACH-13 que corresponde a un varón prematuro de 31 semanas con CIR severo, fémures cortos e incurvados, desproporción entre cráneo-cuerpo y entre el segmento superior e inferior y con el cráneo poco osificado. Como antecedentes personales, la pareja presenta otro feto fallecido con iguales signos clínicos. El diagnóstico de displasia mesomélica de Langer se propone como diagnóstico diferencial tras encontrar la probable delección en la región reguladora y por el antecedente de un feto anterior con similar clínica, que indicaría una enfermedad recesiva. El resultado de la secuenciación del gen *SHOX* fue negativo.

Desconocemos la clínica presentada por el resto de pacientes con alteración del gen *SHOX*: ACH-28, ACH-81 y ACH-112.

Las muestras de este primer grupo son muestras extraídas por el método salino que obtiene ADN con una concentración de sales demasiado alta y demasiado dispar, para poder realizar el ensayo de MLPA en óptimas condiciones. En estas muestras se realizó el estudio mediante microsatélites STRs como método de cribado. A partir del año 2004, el método de extracción de ADN cambió a uno automatizado (Extractor automático Biorobot EZ1 (*Quiagen, Hilden Alemania*)) lo que permitió sistematizar la técnica de MLPA (P018) y utilizarlo como método de cribado, lo que aumentó la sensibilidad del estudio ya que éste es un método directo. Sin embargo, aunque mejoró la extracción de ADN, este método tampoco permitía un buen rendimiento ni una reproducibilidad adecuada debido a la concentración de sales todavía demasiado alta para su estudio. A partir del año 2009, Qiagen incorpora a la extracción automática un paso adicional de precipitación con etanol al 80% que permite la obtención de una muestra de ADN con una concentración óptima de sales para el uso de la técnica de MLPA, por lo que a partir de este año el método de cribado es el MLPA quedando relegado a un uso complementario el estudio de STRs. La última muestra en la que se utilizó los microsatélites (STRs) como cribado fue la ACH-112.

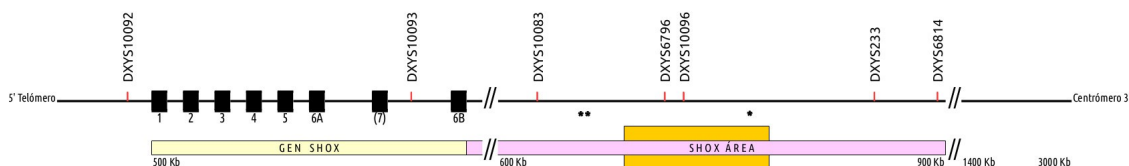
Los 5 microsatélites iniciales utilizados fueron DXYS10092 (región 5' previa al gen *SHOX*), DXYS10093 (región intragénica), DXYS10096, DYS233 y DXYS6814 (región 3' del gen *SHOX*, región PAR1). Se decidió ampliar el estudio, cuando se pudiese, mediante MLPA o mediante estudio familiar, a aquellos casos que presentaban:

- hemi/homocigosidad de los 5 marcadores: situación muy sugerente de delección de la región PAR1.
- hemi/homocigosidad del DXYS10093 exclusivamente: al ser intragénico indicaría delección del gen.
- hemi/homocigosidad del DXYS10096 exclusivamente: al encontrarse en la región putativa reguladora 3'.

- hemi/homocigosidad del DXYS10096 y DXYS233: al encontrarse en la region 3'.

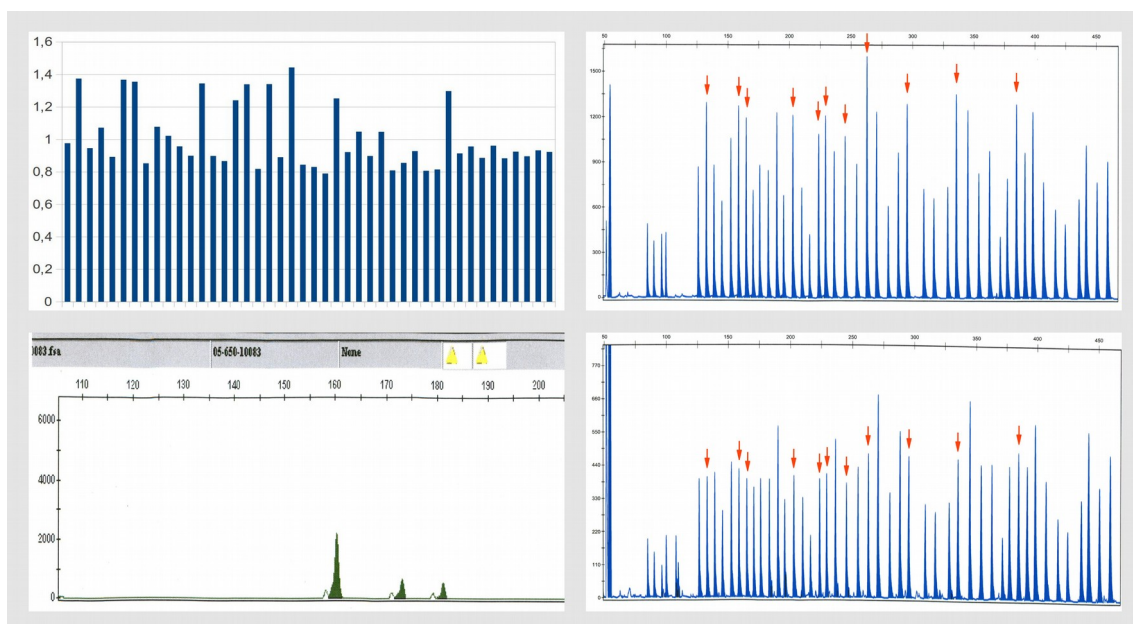
En la **figura 4.30** se puede visualizar la localización de estos marcadores a lo largo del PAR1.

**Figura 4.30: localización de los marcadores en la región PAR1 utilizados en nuestra serie**



Con este criterio se obtuvo que los 3 casos en los que el marcador DXYS10093 presentaba un patrón anormal, existía una mutación en el gen *SHOX*: ACH-28 y ACH-112 presentaban un único pico y el estudio mediante MLPA reveló una delección heterocigota del gen *SHOX*, y el caso ACH-81 presentaba una duplicación que también se confirmó mediante MLPA (**figura 4.31**).

**Figura 4.31. Análisis mediante MLPA del caso ACH-81: superior izquierda: normalización. Superior derecha electroferograma de la paciente y del control (inferior derecha). Las flechas rojas señalan las sondas implicadas. Inferior izquierda: marcador DXYS10083 mostrando 3 alelos (duplicación).**



Sin embargo, en los 22 casos en los que se utilizó los STRs como cribado, 11 presentaban hemi/homocigosidad del marcador DXYS10096: 7 exclusivos y 2 con DXYS233, lo que constituye casi un 50% de los casos, muy por encima de cualquier resultado esperado.

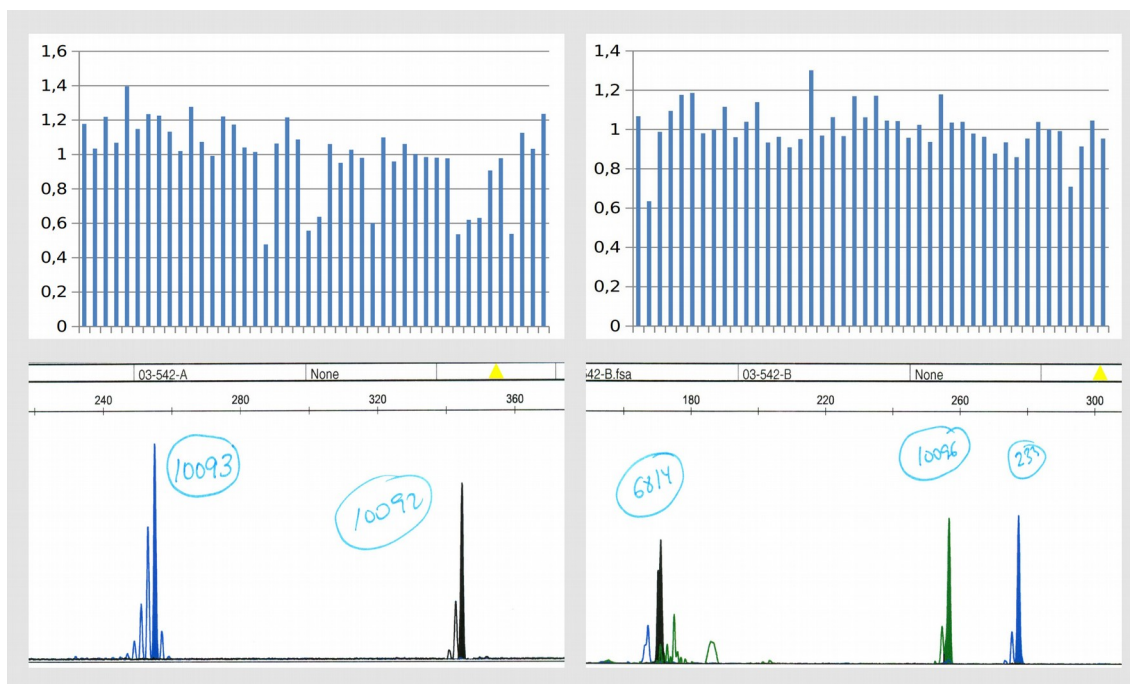
El marcador DXYS10096 se encuentra localizado en la región mínima que Benito-Sanz y col. delimitan en una cohorte de pacientes afectados de Léri-Weill (Benito-Sanz, 2005). Debido a su poca informatividad, es condición necesaria la comprobación con otra técnica o de otro marcador en esa región. Para ello se realizó el estudio de MLPA (SALSA P018) en 4 casos, con resultado normal. En un caso, ACH-27, no se pudo realizar ninguna prueba más por agotarse la muestra. Para los otros 3 casos (ACH-8, ACH-13, ACH-18) se estudió otro marcador STR en la misma región: DXYS6796, con el resultado de heterocigoto para la familia ACH-8 y ACH-18 pero homo/hemicigoto para la familia ACH-13. Dado que la delección de esta región en la que se encuentran estos dos marcadores es la más frecuente en nuestra serie de pacientes con alteración del *SHOX* (5 casos de 15), y siendo conscientes de que habría que realizar el estudio en los progenitores para demostrarlo, sobre todo ante la indicación de otro feto anterior con igual signos clínicos y fallecido lo que puede indicar una consanguinidad, se considera que este paciente muy probablemente presenta delección de la región reguladora, lo que no explica la clínica encontrada.

Veintisiete casos resultaron **negativos** para el estudio ampliado del gen *SHOX*. Estos casos y sus diagnosticos probables se recogen en la **tabla 4.12**. Cuando se puso a punto la secuenciación de los exones codificantes del gen *SHOX*, se secuenciaron 5 muestras de este grupo con resultado negativo.

Destacamos el resultado del caso ACH-64, que pertenece al grupo de pacientes de la República Dominicana muy bien seleccionados en su displasia ósea para estudio a partir de células bucales. Este caso era un varón de 2 años con diagnóstico clínico de pseudoacondroplasia. Entre los antecedentes presentaba un hermano fallecido con iguales características. Cuando se recibieron las muestras de este grupo de pacientes sólo se podía realizar el estudio de *FGFR3* que resultó negativo (año 2003). Con el desarrollo de esta tesis, el segundo gen que se puso a punto fue el gen *SHOX* y se decidió ampliar el estudio a este gen. Presentó homocigosidad en los 5 microsatélites estudiados. Se realizó la técnica de MLPA con un patrón que parecía normal aunque hay que tener en cuenta que se partía de una muestra de células bucales (la concentración de ADN extraído suele ser baja) y no se extrajo con el paso de etanol al 80%. Como no se tenía constancia de que el paciente tuviese un cariotipo realizado, se procesó la muestra con una QF-PCR *multiplex* comercial (PALEX) para aneuploidías que mostró un patrón normal de varón con dos cromosomas sexuales y gen *SRY* positivo. En la **figura 4.32** se muestran estos resultados. Tras este estudio, y a lo largo de la tesis presente, se estudiaron otros genes entre los que se encontraba el gen *COMP* para la pseudoacondroplasia. Sólo se pudo realizar el estudio del exón 13 con resultado normal, por agotarse la muestra.



**Figura 4.32. ACH-64: normalización del MLPA P018 frente a un control mujer (izquierda) y varón (derecha). Patrón de los microsatélites estudiados (DXYS10092, DXYS10093, DXYS10096, DXYS6814 y DXYS233)**



#### 4.3.6.1.2. Grupo IE

Este grupo lo constituyen pacientes derivados de la consulta de endocrinología pediátrica del hospital Infanta Elena. De las 56 familias clasificadas en este grupo, sólo 1 resultó positiva (1,79%): ACH-338 con una deleción heterocigota en la región 3' que incluía 2 sondas: la 5645-L05099 y la 5646-L15507 (P018-E1), que no afectaba al gen *SHOX* y sí a la región reguladora (**figura 4.29**). En la **tabla 4.13** se muestran las características de todos los casos. Se realizó el cariotipo a todos los casos siendo normales.

**Tabla 4.13. Características de los pacientes del grupo IE**

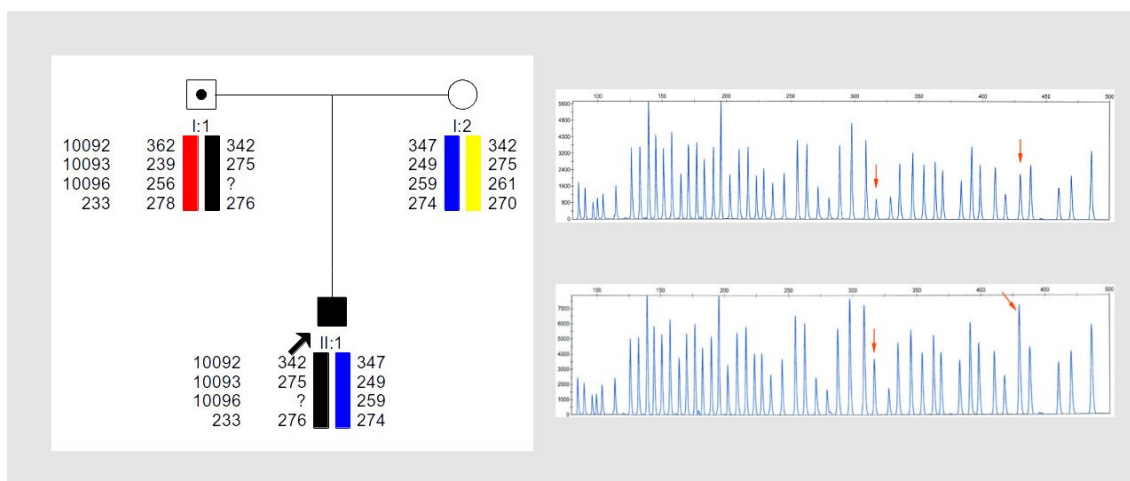
FAMILIA	EDAD SEXO	TALLA (SDS)	TALLA GENÉTICA	TÉCNICA REALIZADAS PARA EL GEN SHOX			RESULTADO SHOX	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO
				STRs	MLPA	SECUENCIACIÓN			
ACH-155	2 a/ ♂	-4,01	169,5 (1,07SDS)	✓	✓		Negativo	CIR no recuperado. AF+	CIR, madre tto HC
ACH-171	12 a/ ♀	-2,1	153 (-1,53SDS)	✓	✓		Negativo	Armónico	RCCD
ACH-176	16 a/ ♀	-4,1	DND	✓	✓*	✓	Negativo	EO retrasada 3 años. AF+	PT+RCCD
ACH-180	4 a/ ♀	-2,4	160,5 (-0,14SDS)		✓		Negativo	EO retrasada 9 meses. AF+	RCCD
ACH-181	7 a/ ♀	-2,9	151,5 (-1,81SDS)		✓		Negativo	Sin interés	TBI
ACH-184	12 a/ ♂	-2,6	DND		✓		Negativo	Sobrepeso. AF+	TBF
ACH-189	14 a/ ♂	-2,5	164 (-2,04)		✓		Negativo	Sobrepeso. AF+	TBI con TBF



FAMILIA	EDAD SEXO	TALLA (SDS)	TALLA GENÉTICA	TÉCNICA REALIZADAS PARA EL GEN SHOX			RESULTADO SHOX	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO
				STR	MLPA	SECUENCIACIÓN			
ACH-191	11 a/♂	DND	DND	✓			Negativo	AF+	desconocido
ACH-195	2 a/♀	-2	159,5 (0,33SDS)	✓			Negativo	Sin interés	RCCD
ACH-202	8 a/♀	-3,06	149,5 (-2,19SDS)	✓			Negativo	AF+	hipotiroidismo subclínico, dislipemia, TBF
ACH-205	8 a/♀	-1,4	159,5 (0,33SDS)	✓			Negativo	DND	desconocido
ACH-209	18 m/♂	-0,37	178,25 (+0,47SDS)	✓			Negativo	CI no recuperado	CIR+PT+RCCD
ACH-213	8 a/♀	-2,48	163,5(+0,42SDS)	✓			Negativo	EO retrasada. AF+	¿RCCD?
ACH-215	9 a/♀	-1,3	165 (+0,7SDS)	✓			Negativo	DND	RCCD
ACH-216	6 a/♀	DND	153,5 (-1,44SDS)	✓			Negativo	AF+	RCCD, madre tto HC
ACH-217	4 a/♀	-2,94	157,75 (-0,65SDS)	✓			Negativo	CIR no recuperado. AF+	CIR severo
ACH-218	5 a/♀	DND	152 (-1,72SDS)	✓			Negativo	AF+	gemelar
ACH-220	9 a/♀	-2,7	159,75 (-0,28SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 3 años.	RCCD
ACH-232	7 a/♀	DND	153,5 (-1,44SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 3 años.	RCCD
ACH-233	13 a/♀	-2,1	155 (-1,16SDS)	✓			Negativo	AF+	TBI
ACH-237	8 m/♂	-4,4	178 (+0,42SDS)	✓			Negativo	Sin interés	TBI
ACH-238	12 a/♀	DND	DND	✓			Negativo	AF+	PT+gemelar+RCCD
ACH-240	8 a/♀	-2,88	153,5 (-1,44SDS)	✓			Negativo	TDAH, retraso madurativo, CIR no recuperado	CIR ¿raquitismo resistente a vitamina D?
ACH-246	6 a/♂	DND	172 (-0,63SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 2,5 años. AF+	RCCD
ACH-249	10 a/♂	-1,78	166,5 (-1,65SDS)	✓			Negativo	Fenotipo armónico	desconocido
ACH-250	7 a/♂	-3,41	164,4 (-2,01SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 2 años. Armónico. AF+	PT+RCCD+TBF
ACH-251	9 a/♂	-0,94	172,5 (-0,55SDS)	✓			Negativo	Sin interés	desconocido
ACH-253	4 a/♀	-1,4	157,5 (-0,7SDS)	✓			Negativo	Sin interés	RCCD
ACH-254	5 a/♀	DND	159,5 (0,33SDS)	✓			Negativo	Cierta hiperlaxitud articular	RCCD
ACH-257	9 a/♀	-2,27	155,5 (-1,07SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 2,5 años. AF+	RCCD
ACH-262	8 a/♀	-2,02	151,78 (-1,76SDS)	✓			Negativo	AF+	TBI
ACH-266	5 a/♂	-2,31	161,5 (-2,48SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 1,3 meses. AF+	RCCD+TBF
ACH-268	7 a/♂	-2,03	164,5 (-1,95SDS)	✓			Negativo	QX osteosarcoma	RCCD+TBF
ACH-269	9 a/♂	-1,51	172,5 (-0,55SDS)	✓			Negativo	Sin interés	desconocido
ACH-271	8 a/♂	-3,06	168,5 (-1,25SDS)	✓			Negativo	AF+	RCCD
ACH-272	5 a/♀	-2,18	173,5 (+2,27SDS)	✓			Negativo	Sin interés	TBI con TBF
ACH-275	6 a/♀	-2,16	154,5 (-1,26SDS)	✓			Negativo	CIR no recuperado. AF+	CIR+RCCD
ACH-277	14 a/♀	-2,61	154,5 (-1,26SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 2 años.	gemelar+RCCD
ACH-278	7 a/♀	-2,42	163,5 (+0,42SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 1,8.	RCCD
ACH-280	7 a/♂	-3,25	161,5 (-2,48SDS)	✓			Negativo	AF+	RCCD+TBF
ACH-289	5 a/♂	DND	170,5 (-0,9SDS)	✓			Negativo	Gran preterino con retinopatía grado I e infección neonatal	RGPT
ACH-295	15 a/♂	-2,13	166,5 (-1,6SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 3 años.	RCCD
ACH-298	7 a/♂	-2,1	172,5 (-0,55SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 2 años. <i>Cubitus valgus</i>	PT+RCCD
ACH-303	10 a/♀	-3	150,3 (-2,16SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 2 años. AF+	RCCD+TBF. Primo tto HC
ACH-304	7 a/♀	-3,37	152,75 (-1,58SDS)	✓			Negativo	Sin interés	RCCD
ACH-313	11 a/♀	-2,61	162,03 (+0,14SDS)	✓			Negativo	Deporte de alta competición. AF+	RCCD. Padre tto HC
ACH-314	4 a/♀	-3,23	156 (-0,98SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 1,4 años. AF+	RCCD
ACH-319	10 a/♀	-1,86	165 (+0,7SDS)	✓			Negativo	Dismorfia facial. AF+	desconocido
ACH-321	7 a/♀	-2,3	163,9 (+0,49SDS)	✓			Negativo	EO retrasada 1,3 años.	RCCD
ACH-322	3 a/♂	-1,98	168,5 (-1,25SDS)	✓			Negativo	sobrepeso	RCCD
ACH-324	3 a/♂	-2,3	164,5 (-1,95SDS)	✓			Negativo	Sin interés	gemelar
ACH-329	9 a/♀	-0,5	152,78 (-1,58SDS)	✓			Negativo	retraso del aprendizaje	gemelar
ACH-333	2 a/♀	-2,13	150 (-2,09SDS)	✓			Negativo	AF+	CIR+PT +TBF
ACH-334	12 a/♂	-1,98	163,72 (-2,09SDS)	✓			Negativo	Sobrepeso. AF+. Madre ligera limitación rotación externa	TBI con TBF
ACH-337	2 a/♀	-2,04	153,9 (-1,37SDS)	✓			Negativo	AF+. IG-F1 disminuido	Déficit de HC
ACH-338	2 a/♂	-1,66	166,25 (-1,65SDS)	✓			Delección heterocigota	FIV-ICSI. Incurvación del radio	Alteración SHOX

El caso positivo (ACH-338) era un varón de 2 años nacido tras un embarazo obtenido por reproducción asistida (FIV-ICSI) y cesárea a las 39 semanas de gestación. El peso al nacimiento fue de 2900g (-0,64 SDS) con una talla de 49 cm (-1,61 SDS). Por la altura de los progenitores (madre 157cm y padre 162,5cm), la talla genética esperada era de 166,25 cm (-1,65SDS). Acude al pediatra endocrino por estancamiento pondoestatural. En el momento de la consulta con el pediatra, a la edad de 21 meses, presenta una talla de 78,5cm (-1,6SDS) con índice de masa corporal (IMC) de 14 (-2,2SDS). Tras el estudio positivo en el *probandus*, se pinchó a los progenitores presentando la misma delección heterocigota el padre (-2,3SDS de altura). Un año más tarde se realiza una radiografía de los antebrazos al niño y se observa una “leve incurvación radial de las diáfisis de los radios de formar simétrica y bilateral sin incurvación cubital de la superficie articular de los radios de modo que no hay criterios concluyentes de una deformidad de Madelung”. Se realizó el estudio mediante microsatélites detectándose la delección también con el marcador DXYS10096 (**Figura 4.33**).

**Figura 4.33.** ACH-338: Árbol genealógico (izquierda). Electroferograma del MLPA del paciente (arriba derecha) y del control (abajo derecha)



De la **tabla 4.13** se puede observar que de los 56 casos iniciales, en 8 (14,3%) no tenemos el dato de la talla en el momento de estudio, 37 (66,1%) presentan una talla por debajo de -2SDS, que es el criterio para el diagnóstico de talla baja, y 11 (19,6%) presentan una talla superior a -2SDS. De hecho hay que constatar que precisamente el único caso positivo no presentaba una talla baja que indicara el inicio de los estudios genéticos.

A todos ellos se realizó el estudio mediante la SALSA P018 de la técnica de MLPA. La familia ACH-176, con la versión SALSA P018-D1 presentaba una delección heterocigota de la sonda 5647-L05101, delección que presentaban tanto su madre como su padre. Estas 3 muestras con la versión SALSA P018-E1, en el que se habían sustituido varias sondas, incluida la 5467-L05101, resultó con un patrón de normalidad en los 3 casos. Ante este resultado negativo, y dada la edad

del paciente con 16 años y una talla de -4,1SDS se decidió estudiar mediante secuenciación el gen completo con resultado normal.

Adicionalmente se realizó el estudio mediante microsatélites a las tres primeras familias pero no se continuó porque ya se había introducido el paso adicional de etanol en la extracción de ADN y la reproducibilidad de la técnica de MLPA ya era adecuada.

A las 14 primeras familias también se realizó la secuenciación de los 3 exones del gen *FGFR3* para las mutaciones más frecuentes para la HCH: codones 538, 540 y 650, todos con resultados negativos. Ante un fenotipo absolutamente armónico y dado el bajo rendimiento contrastado, se decidió no continuar con este estudio en los siguientes pacientes (Mamada, 2006).

Del análisis de los **casos negativos** podemos destacar que, de los 55 casos, 34 de ellos (61,8%) se sospechaba un retraso del crecimiento constitucional y del desarrollo (RCCD). En 11 casos presentaban talla baja familiar de los cuales 5 además presentaban RCCD. Por tanto, los 34 casos de RCCD y los 6 de TBF constituyen el 72,7% de los casos remitidos para estudio de talla baja.

En los 17 casos restantes con resultado **negativo** y que no presentan TBF, ni RCCD ni déficit de hormona de crecimiento, nos encontramos:

- 4 casos con diagnóstico final de TBI al no encontrarse ninguna justificación para su talla baja con una talla genética no patológica *a priori*.
- 2 casos con crecimiento intrauterino retardado (CIR):
  - *ACH-155*: presentaba al nacimiento -4,78SDS y a los 2 años seguía con una talla de -4,01.
  - *ACH-217*: presentaba al nacimiento una talla muy patológica con -7,5SDS. A los 4 años tenía una talla aún patológica pero recuperada frente a la inicial.
- 3 casos de gemelares que suelen presentar una talla y/o peso bajos al nacimiento:
  - *ACH-218*: sólo consta el bajo peso al nacimiento
  - *ACH-324*: presentaba al nacimiento -1,18SDS
  - *ACH-329*: presentaba al nacimiento -3,18 SDS. La otra melliza sí había conseguido recuperar su crecimiento.
- 1 gran pretérmino de 28 semanas que requirió incubadora (*ACH-289*). Sufrió varias infecciones neonatales y presenta una retinopatía de grado I.

- 1 sospecha de raquitismo resistente a la vitamina D: ACH-240: CIR desde la semana 35 de gestación con una talla al nacimiento de -3,4SDS. Clínicamente además presenta retraso psicomotor y trastorno de déficit de atención e hiperactividad con estudios genéticos negativos para estas patologías.
- 6 casos sin un claro diagnóstico:
  - 3 no consta ningún antecedente significativo,
  - 2 sólo consta un antecedente familiar positivo,
  - 1 no constan datos.

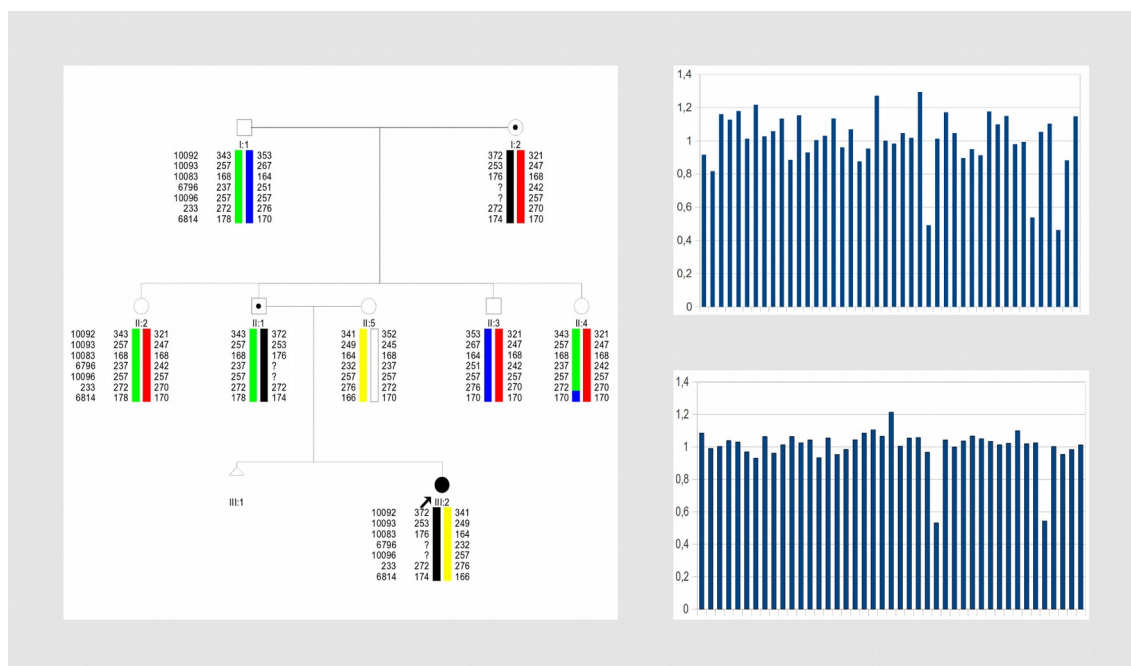
#### 4.3.6.1.3 Grupo RAPPOLD

Este grupo lo constituyen 31 familias con 35 pacientes, ya que 4 familias tienen estudio sobre 2 hermanos, que fueron evaluados en la consulta de Endocrinología Pediátrica (Dr. Leandro Soriano Guillén) según la escala de Rappold (Rappold, 2007). La proporción de niños:niñas fue de 14:21. De las 31 familias, 3 casos resultaron positivas (9,7%). Estos 3 casos (ACH-138, ACH-261 y ACH-339) presentaron una delección heterocigota en la región reguladora en 3' de 2 sondas: la sonda 5645-L05099 y la sonda 5646-L15507, de la versión P018-E1. En los 3 casos era heredada de un progenitor.

- ACH-138: mujer de 12 años que acude a la consulta por presentar talla baja. En la exploración del pediatra, objetiva hipocrecimiento armónico, sin rizomelia ni deformidad de Madelung. Presentaba una talla de -2,62SDS con una talla genética -1,1SDS. Aplicando la escala de Rappold, la puntuación obtenida era de 7. El estudio mediante la SALSA P018-D1 mostró un patrón anormal consistente en la delección heterocigota de 3 sondas de la región del par 3': desde 05645-L05099 hasta 05647-L05101. El estudio en los progenitores puso de manifiesto que era heredado del padre que presentaba una talla -2,57SDS sin otra manifestación clínica. Se pudo estudiar al resto de familiares, 2 tías y 1 tío paterno así como a los abuelos, que puso de manifiesto que era la abuela paterna la portadora de la alteración (-0,23SDS sin ninguna clínica asociada) y ningún otro descendiente de esta señora había heredado esta alteración. Fue el estudio en la abuela con la SALSA P018-E1 la que mostró una delección heterocigota de 2 sondas, no de 3, de la 05645-L05099 y de la 05646-L15507 (**Figura 4.34**). El estudio repetido con esta versión de la SALSA en la *probandus* y su padre confirmó esta delección. Consultado con la casa comercial (MRC-Holland) confirmaron la presencia de un SNP en la sonda 05645-L05099 de la versión D1, sustituida en la E1. El estudio de microsatélites puso de manifiesto hemi/homocigosidad para el marcador DXYS10096 que se encuen-

tra en el interior de esta delección por lo que se pusieron a punto dos nuevos marcadores: DXYS10083, fuera de esta región pero cercano, y el DXYS6796 también en el interior de la delección. Se pudo observar la hemicigiosidad de este marcador y la cosegregación en la familia. El patrón de herencia viene ligado al cromosoma X de la abuela paterna.

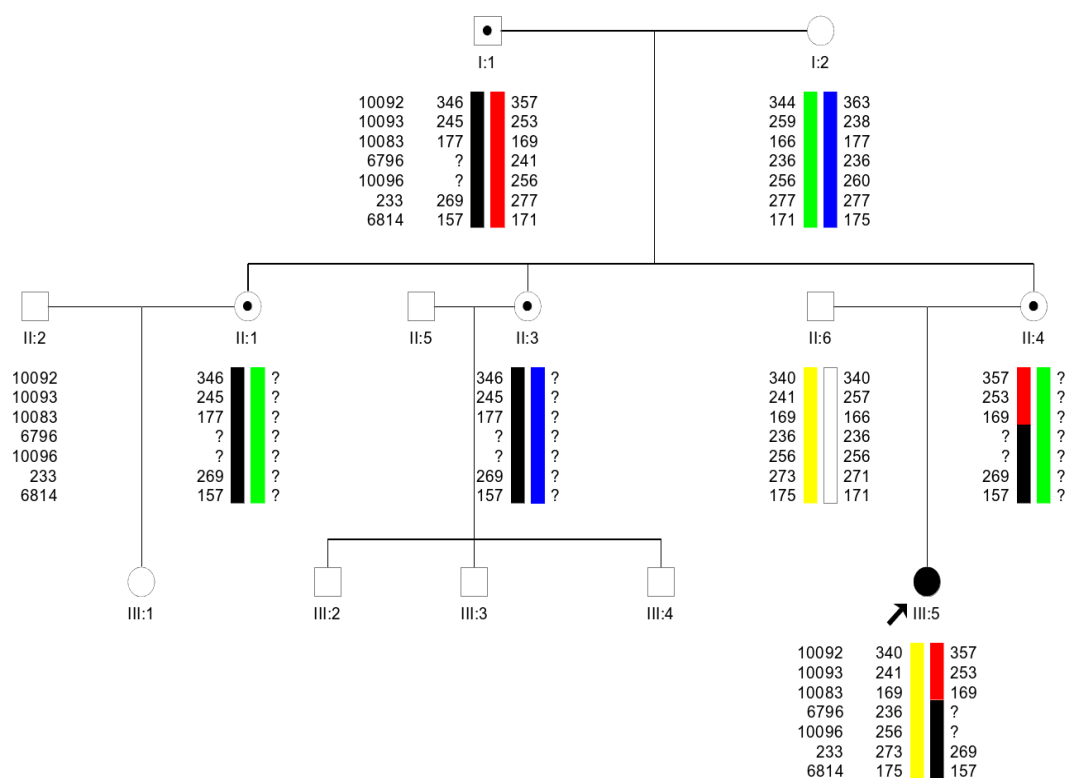
**Figura 4.34. ACH-138: Árbol genealógico (izquierda). Normalización MLPA P018-D1 (superior derecha) y P018-E1 (inferior derecha)**



- **ACH-261:** mujer de 8 años de edad nacida a las 37 semanas sin sospecha de presentar CIR en el embarazo pero con una talla al nacimiento de  $-4,41\text{SDS}$ . La talla presentada a la edad de 8 años era de  $-3\text{SDS}$  con una talla genética estimada en  $-1,26\text{SDS}$ . Presenta déficit de atención e hiperactividad en seguimiento por neuropediatría. En la radiografía se observa un ligero incurvamiento de cúbito y radio con una edad ósea retrasada de 2 años. La puntuación en la escala de Rappold fue de 5. La alteración es heredada de su madre que presenta una talla final  $-0,79\text{SDS}$  sin clínica aparente. Se pudo realizar el estudio familiar en las 2 tías maternas y los abuelos a partir de una muestra de células bucales y se puso de manifiesto que ambas tías eran portadoras de la alteración así como el abuelo (talla de  $-2,39\text{SDS}$ ). El estudio por microsatélites con los 7 marcadores, ya que el DXYS10096 de nuevo no era informativo en gran parte de los familiares, permite describir 3 hipótesis:

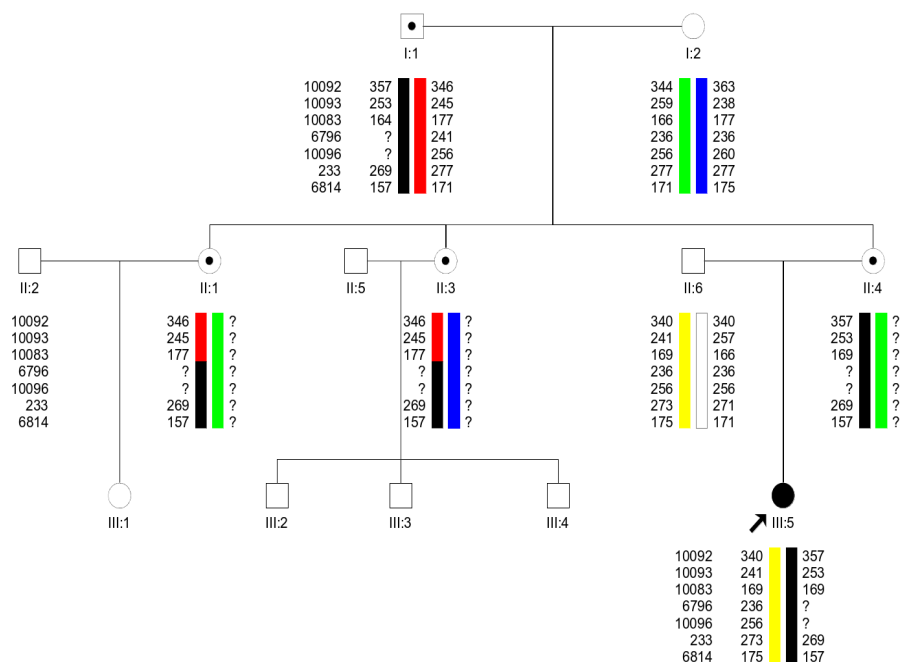
- Hipótesis I: la primera tía (II:1), con una talla de -1,16 SDS, presenta los 7 marcadores del cromosoma X de su padre (abuelo de la *probandus*), como la segunda tía, que presenta una talla de +0,88 SDS. La madre de la *probandus* presentaría los 3 primeros marcadores del cromosoma Y y, a partir del DXYS10096, se sobrecruza con el cromosoma X paterno justo donde se encuentra la delección del gen *SHOX*. Este alelo recombinante es el heredado por la *probandus* (**figura 4.35**).

**Figura 4.35. Posible segregación de haplotipos para la familia ACH-261 (hipótesis I)**

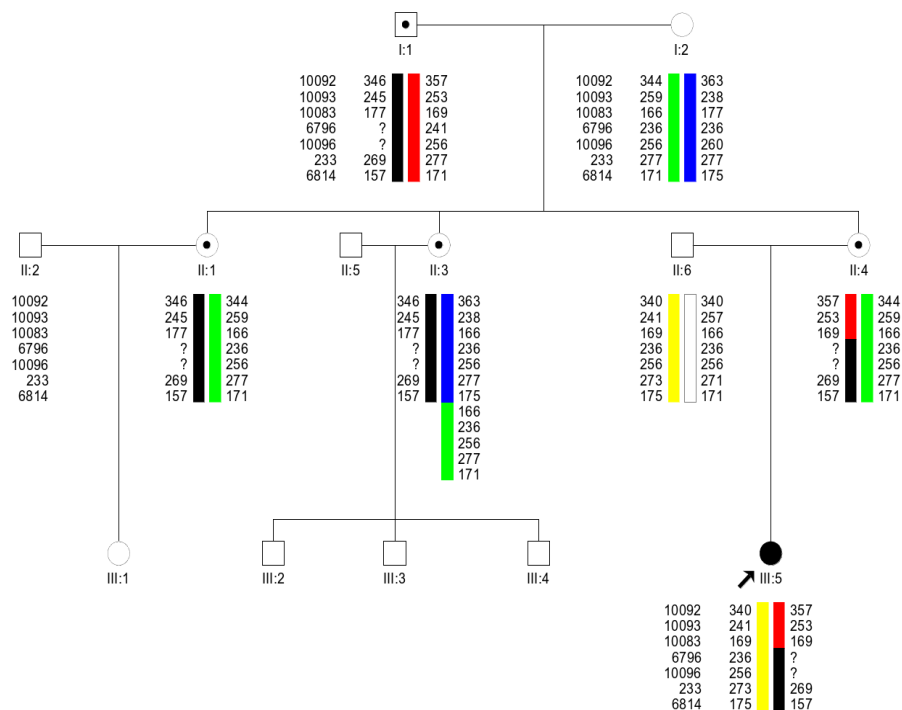


- Hipótesis II: las dos tías son las que reciben el alelo recombinante y la madre de la *probandus* recibe el cromosoma X del abuelo sin recombinar (**figura 4.36**).

Figura 4.36. Posible segregación de haplotipos para la familia ACH-261 (Hipótesis II)

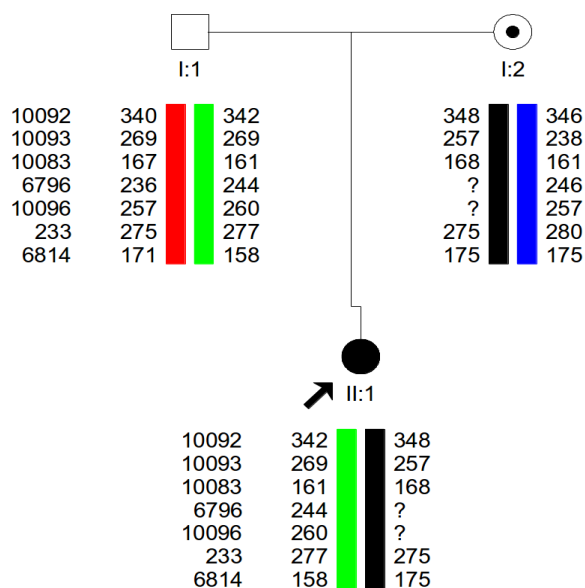


- Hipótesis III: hipótesis I añadiendo que a la segunda tía (II:3) presenta un nuevo evento: la duplicación de parte de la región 3' del PAR1, en los 4 últimos marcadores a partir del DXYS10096. Esta duplicación parece venir del otro cromosoma de la abuela aunque comparte con el cromosoma Y del abuelo 3 de estos marcadores, exceptuando el DXYS10083 que sólo aparece en abuela por lo que nos inclinamos más hacia la duplicación del alelo de la abuela (*figura 4.37*).



- ACH-339: mujer de 9 años que presentó CIR en el embarazo. Desde los 18 meses estaba siendo seguida por endocrinología pediátrica (en otro hospital) por presentar retraso pondoestatural. A la exploración presentaba una talla de -1,31 SDS con una talla genética estimada en +0,23 SDS, cierta dismorfia con frente ancha, raíz nasal ancha, *flitrum* marcado y cuello largo. El padre presentaba un defecto del cierre de la línea media en el paladar. Tenía un hermano mayor sano. Los progenitores refieren talla baja en ambas ramas familiares. Tras la aplicación de la escala de Rappold, los puntos finales fueron de 2 al presentar una talla sentado/talla>55,5%. El estudio realizado en sus progenitores puso de manifiesto que era la madre la portadora de la delección que no presentaba clínica sugerente y su talla final era de +0,51SDS. En la figura 6 se muestra el árbol y la delección de los marcadores DXYS 6796 y DXYS10096 (**figura 4.38**).

**Figura 4.38. Árbol genealógico de la familia ACH-339**



En la **tabla 4.14** se muestran las características de los pacientes de este grupo y la puntuación alcanzada en la escala de Rappold. Se realizó el cariotipo a todos los pacientes siendo normales en todos ellos. Así mismo el estudio mediante secuenciación del gen *SHOX* fue negativo en todos los casos.

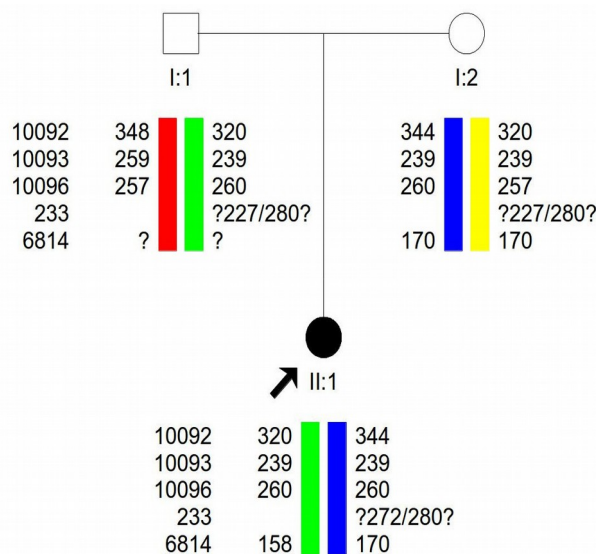


Tabla 4.14. Características de los pacientes del grupo RAPPOLD

FAMILIA	EDAD SEXO	TALLA (SDS)	TALLA GENÉTICA	TÉCNICA REALIZADAS PARA EL GEN SHOX			ESTUDIO DE FGF3	DEFORMIDAD DE MANEJING	BRAZA/TALLA (% 2 PDS)	TALLA SHOX/TALLA (% 2 PDS)	LIM-PI (% PDS)	CUBITOS VALGUS (% PDS)	ANTEBRAZO CORTO (% PDS)	INCLINACIÓN ANTERBRAZO (% PDS)	HIPERTROFIA MANOTRILLAS (% PDS)	DISOCACIÓN DE CUBITO (EDOS (% PDS)	PUNOS ESCALA DE RAPPOLD	RESULTADO SHOX	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO
				STS	MILIN	SECUELA														
ACH-134	5 a/♀	-1,8	146 (-2,84SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Inseminación artificial	TBF
ACH-138	12 a/♀	-2,62	154,2 (-1,1SDS)	✓	✓		✓	x	x	x	✓	x	x	x	✓	x	7	Delección heterocigota		Alteración SHOX
ACH-146	9 a/♀	-2,13	141,25 (-3,72SDS)	✓	✓	✓	✓	x	✓	x	x	x	x	x	x	x	2	Negativo	Ecuador	TBI+TBF
ACH-149	9 a/♀	-3,1	161 (-0,05SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	China. Edad ósea retrasada 1,5 años	TBI
ACH-157	8 a/♀	-2,8	151 (-1,91SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Prétermino de 35 semanas. Acortamiento del 4º metacarpiano	TBI
157	10 a/♀	-1,7	151 (-1,91SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Acortamiento 4º metacarpiano, ligera clinodactilia 2º y 4º dedo	TBI+TBF
ACH-160	12 a/♂	-3,4	178 (+0,42SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Acortamiento 4º metacarpiano, Arnold-Chiari tipo I	RCCD
ACH-163	5 a/♀	-2,4	141,2 (-3,46ds)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Edad ósea retrasada 2,5 años	TBI+TBF
ACH-164	3 a/♂	-1,8	165 (-1,66SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Sin interés	RCCD
ACH-166	5 a/♀	-1,8	158,5 (-0,51SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Neurocistrosis	Normal
ACH-167	6 a/♂	-1,67	162 (-2,25SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Prétermino de 35 semanas. Edad ósea retrasada 2 años	RCCD+TBF
ACH-168	12 a/♀	-2,4	150 (-1,96SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Edad ósea retrasada 2 años	TBI
ACH-169	13 a/♂	-1,4	164 (-2,04SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Edad ósea retrasada, no se puede descartar celiaquia	RCCD+TBF
ACH-174	10 a/♀	-2,4	151 (-1,91SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Edad ósea retrasada 2 años	RCCD
ACH-187	3 a/♂	-1,77	166,5 (-1,5SDS)	✓	✓	✓	✓	x	✓	x	x	x	x	x	x	x	2	Negativo	Feto macrosómico. Madre con dudoso Madelung	Normal
ACH-188	10 a/♂	-1,8	166,7 (-1,46SDS)		✓	✓	✓	x	x	x	✓	✓	x	x	x	x	6	Negativo	TDAH	TBI
ACH-190	8 a/♂	-3,1	159 (-2,64SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	✓	x	x	x	x	x	4	Negativo	Ecuador. Gemelar. CIR. Edad ósa retrasada 4 años	Gemelar+CIR+RCCD
190	8 a/♂	-2,8	159 (-2,64SDS)	✓	✓	✓	✓	x	x	x	✓	x	x	x	x	x	4	Negativo	Ecuador. Gemelar. CIR. Edad ósea retrasada 3,5 años	Gemelar+CIR+RCCD
ACH-199	10 a/♀	-2,03	161 (-0,05SDS)		✓	✓		x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Sin interés	RCCD
ACH-201	5 a/♀	-1,88	153 (-1,44SDS)		✓	✓		x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Edad ósea retrasada	RCCD
ACH-214	9 a/♀	-2	164 (+0,47SDS)		✓	✓		x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Edad ósea retrasada	RCCD
ACH-219	7 a/♂	-2	165,8 (-1,75SDS)		✓	✓		x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Edad ósea retrasada	RCCD
ACH-224	9 a/♂	-1,86	165,5 (-1,72SDS)		✓	✓		x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Edad ósea retrasada 3 años	RCCD
224	10 a/♂	-1,9	165,5 (-1,72SDS)		✓	✓		x	x	x	✓	x	x	x	x	x	4	Negativo	Edad ósea retrasada 2 años	RCCD
ACH-235	9 a/♂	-2,59	172,5 (-0,56SDS)		✓	✓		x	✓	x	x	x	x	x	x	x	2	Negativo	Edad ósea retrasada 1,5 años	RCCD
ACH-256	3 a/♀	-2	160 (-1,12SDS)		✓	✓		x	✓	x	x	x	x	x	x	x	2	Negativo	Edad ósea retrasada 2 años. Impresión de acortamiento de miembros	RCCD
ACH-261	8 a/♀	-3	154,5 (-1,26SDS)	✓	✓			x	✓	x	x	x	x	✓	x	x	5	Delección heterocigota	CIR. Edad ósea retrasada 2 años	Alteración SHOX
ACH-267	11 a/♂	-2,15	150,5 (-1,88SDS)		✓	✓		x	x	x	✓	x	x	x	x	x	4	Negativo	Ecuador.	TBI
ACH-285	10 a/♀	0,53	131,5 (-5,53SDS)		✓	✓	✓	Dudoso	x	x	✓	x	x	x	x	x	4	Negativo	Ecuador. Madre disarmónica con antebrazo. Pubarquia precoz	TBF
ACH-291	11 a/♀	-1,7	154,5 (-1,26SDS)		✓	✓		x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	7 meses de tto HC (privado) a los 10 años	Normal
291	8 a/♀	-0,09	154,5 (-1,26SDS)		✓	✓		x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Sin interés	Normal
ACH-292	16 a/♂	-1,96	161 (-2,57SDS)		✓	✓		x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Sin interés	TBF
ACH-296	11 a/♀	-2,07	158,5 (-0,51SDS)		✓	✓		x	x	x	x	x	x	x	x	x	0	Negativo	Ecuador. Edad ósea retrasada 1,5 años	TBI
ACH-300	8 a/♀	-1,21	164,5 (+0,60SDS)		✓	✓		x	x	x	x	x	x	✓	x	x	3	Negativo	Sin interés	Nomal
ACH-339	9 a/♀	-1,31	162,5 (+0,23SDS)	✓	✓			x	x	✓	x	x	x	x	x	x	2	Delección heterocigota	CIR. Dismorfia	Alteración SHOX

Se nos presentó un nuevo caso de delección heterocigota con la SALSA P018-D1 que no se confirmó en la SALSA P018-E1, por lo que se le dió como resultado final a la paciente, ausencia de alteraciones en la región analizada. Este caso, ACH-146, se encuentra entre los últimos casos en los que se estudia por microsatélites antes que por MLPA (año 2009). El estudio mediante microsatélites (STRs) indicaba hemi/homocigosidad de DXYS10093+DXYS10096, lo cual era muy sugerente de alteración en el gen *SHOX* sobre todo por la hemi/homocigosidad del marcador DXYS10093, altamente informativo. El estudio mediante MLPA SALSA P018-D1 indicó la ausencia de la delección en el gen pero sí mostró una delección heterocigota de la sonda 5647-LO5101, que se encuentra en la región reguladora (hemicigosidad DXYS10096). Se solicitó muestra de los progenitores y resultó que la delección heterocigota era heredada del padre. El estudio de microsatélites en la familia indicó que ambos progenitores compartían alelos con el mismo número de pares de base tanto para DXYS10093 como para DXYS10096 por lo que era poco probable una hemicigosidad (**figura 4.39**). Con la experiencia en otros casos de los patrones de anomalía en los MLPA de las SALSA P018-D1 frente a P018-E1, se repitió el estudio con esta versión mostrando un patrón de absoluta normalidad.

**Figura 4.39. Árbol genealógico de la familia ACH-146**



Se realizó la ampliación de estudios genéticos con el análisis de los codones 538, 540 y 650 del gen *FGFR3*, que son los más prevalentes para la HCH, en 19 de los 35 casos (54,3%). Dado el bajo rendimiento en pacientes totalmente armónicos y el alto porcentaje de diagnóstico con RCCD, se dejó de realizar a mitad del estudio estas amplificaciones dada la baja rentabilidad diagnóstica (Mamada, 2006). Sólo se realizaron en aquellos casos en los que había una indicación más, como es la disarmonía presentada por la madre de la paciente ACH-285, que resultó ser negativo.

De nuevo el diagnóstico más frecuente es un probable RCCD con 13 casos que supone, sobre las 31 familias, un 41,8%. Le siguen los 8 casos de TBI (25,8%), 4 casos de TBF y 4 casos de talla dentro del rango de la normalidad (12,9% para cada uno) y los 3 casos por alteración del gen *SHOX* (9,6%).

La suma de los 13 casos de RCCD y los 4 de TBF constituyen el 54,8% de los casos remitidos para estudio de talla baja.

#### 4.3.6.1.3.1. Valoración de la escala de Rappold

Rappold propone dos puntos de corte para la selección de pacientes candidatos a estudio del gen *SHOX* por TBI:  $<4$  y  $<7$  (Rappold, 2007). Los pacientes que presenten una deformidad de Madelung, ya tienen de por sí una indicación de estudio del gen *SHOX*. Es por eso que a la paciente de la familia ACH-285 se le incluyó en esta serie.

El criterio más repetido es un  $IMC > P50$  que se encuentra en 7 pacientes, uno de ellos una afecta (ACH-138). Le sigue la relación braza/talla  $<96,5\%$  en 5 casos, uno de ellos en otra pacientes afecta (ACH-261). Dos casos presentaron incurvación del antebrazo y por último, hay 1 caso con *cubitus valgus*, otro con relación talla sentado/talla  $>55,5\%$  (la tercera paciente afecta, ACH-339) y un último con hipertrofia de pantorrillas (**tabla 4.14**).

Veintiun casos tuvieron una puntuación de 0 (60%). Poniendo el punto de corte en  $<4$ , suman un total de 27 casos (77,1%) a los que no se les recomendaría realizar un estudio del gen *SHOX*. Si utilizamos el punto de corte más estricto,  $<7$ , esta cifra sube a 34 (97,1%).

Utilizando el punto de corte  $<4$  no detectaríamos la alteración encontrada en la familia ACH-339 (2 puntos) y utilizando el punto de corte  $<7$  además tampoco detectaríamos a la familia ACH-261 (5 puntos). Sólo se hubiese detectado a la familia ACH-138.

A pesar de la muestra pequeña, podemos definir unos valores predictivos (positivos (VPP) y negativos (VPN)), sensibilidad y especificidad para el punto de corte  $<4$ . Partiendo de los 34 pacientes (eliminando la familia ACH-285 por dudosa deformidad de Madelung), para un punto de corte  $<4$  se muestran en la **tabla 4.15** los valores encontrados:

**Tabla 4.15. Valores predictivos positivos y negativos, sensibilidad y especificidad de la escala de RAPPOLD para un punto de corte menor de 4**

$\geq 4$	2	6	
$< 4$	1	26	
	Positivo	Negativo	
	Prueba diagnóstica		
VPP	VPN	Sensibilidad	Especificidad
25,00%	96,30%	66,70%	81,30%

Este punto de corte presenta unos VPP bajos pero altos para VPN, es decir, si un paciente tiene una puntuación menor de 4, la probabilidad de que NO haya alteración en el gen *SHOX* es del 96,3%.

Sin embargo, la sensibilidad, es decir, la capacidad que tiene de detectar a un paciente con alteración en el gen *SHOX* no es alta: con un punto de corte en 4, no somos capaces de diagnosticar a 1/3 de los pacientes. Pero la especificidad sí lo es por lo que es capaz de detectar al paciente no afecto en un 81,3%.

La serie es demasiada pequeña para el punto de corte 7 por lo que no podemos interpretarla.

#### 4.3.6.1.4. Grupo OTROS

Está formado por pacientes tanto del la FJD como de otros hospitales, pero no del Hospital Infanta Elena, con indicación de estudio del gen *SHOX* pero no valorados baja la escala de Rappold por el Dr. Leandro Soriano Guillén (**tabla 4.16**).

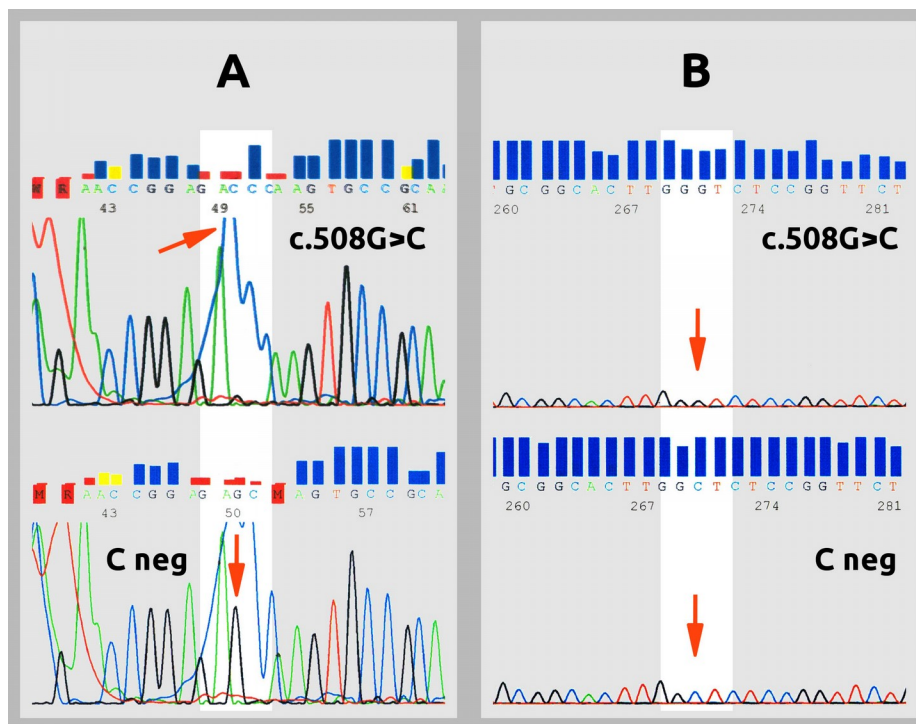
**Tabla 4.16. Características de los pacientes del grupo OTROS**

FAMILIA	EDAD SEXO	INDICACIÓN CLÍNICA	CARIOTIPO	TALLA (SDS)	TALLA GENÉTICA	TÉCNICA REALIZADAS PARA EL GEN SHOX			ESTUDIO DE FGFR3	RESULTADO ESTUDIOS	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO
						STR	MLPA	SECUENCIACIÓN				
ACH-109	72 a/♂	Estudio gen <i>SHOX</i>	NP	158 (-3,1SDS)	DND	✓	✓			Delección heterocigota gen <i>SHOX</i>	Nieta con deformidad de Madelung	Alteración <i>SHOX</i>
ACH-115	DND/♀	Estudio gen <i>SHOX</i>	45,X[8]/46,XX[92]	DND	DND		✓			Aneuploidía	DND	Variente de Turner
ACH-124	28 a/♀	Estudio gen <i>SHOX</i>	45,X[7]/46,XX[2];91[XXX]	147,5 (-2,56SDS)	DND		✓			Aneuploidía	Regla espontánea. Coartación de aorta. Infertilidad	Mosaico de aneuploidías del par sexual
ACH-135	1 a/♀	TBI	46,XX	-3SDS	160 (-0,233SDS)	✓	✓	✓	✓	Negativos	Rizomelia, dismorfia facial. AF+ de talla baja	TBI
ACH-136	12 a/♀	TBI	46,XX	-2,8SDS	144,5 (-3,12SDS)	✓	✓		✓	Negativos	China	TBI+TBF
ACH-148	11 a/♂	TB+Madelung	46,XY	-2,44SDS	167 (-1,51SDS)	✓	✓	✓	✓	Negativos	RX a los 12 años: no deformidad de Madelung pero sí pronunciado incurvamiento del radio aunque presenta lesión de fractura de radio a los 9 años.	TBI+RCCD
ACH-150	11 a/♀	Talla baja	46,XX	-1,75SDS	155 (-1,16SDS)	✓	✓			Negativos	Acortamiento 4º metacarpiano, clinodactilia 5º dedo	Normal
ACH-162	29 a/♀	Deformidad de Madelung	NP	157 (-0,79SDS)	DND	✓	✓			Delección heterocigota gen <i>SHOX</i>	AF+ de deformidad de Madelung	Alteración <i>SHOX</i>
ACH-165	11 a/♂	TB	46,XY	112 (-0,71SDS)	DND	✓	✓	✓	✓	Negativos	Prematuro de 35 semanas. Macrocefalia con AF. Frente abombada. Puente nasal ancho. Ligero acortamiento de metacarpianos	Desconocido
ACH-177	6 a/♀	TBI	45,X(Xq)[84]/45,X[14]						✓	Aneuploidía	Bajo peso y talla al nacer. Retraso psicomot	Mosaico de aneuploidías del par sexual
ACH-192	16 a/♂	TBF	46,XY	155 (-3SDS)	160 (-2,75SDS)		✓			Negativos	Ligero acortamiento 4º metacarpiano	TBI+TBF
ACH-196	11 a/♀	Retraso pondoestatural	46,XX				✓			Negativos	Prematuro de 35 semanas. Sepsis neonatal. Hipertrofia de la biopsia hepática negativa.	RCCD
ACH-198	9 a/♀	TBI	46,XX	125 (-2,03SDS)	150,5 (-2SDS)	✓	✓			Negativos	Bolivia. <i>Cubitus velgus</i> .	TBF
ACH-200	6 a/♀	TBI	46,XX	-2SDS	163 (+0,62SDS)		✓		✓	Negativos	Francia. CIR. Heranno con déficit de HC	RCCD
ACH-203	11 a/♀	TBI	45,X[8]/46,XX[17]	129 (-2,2SDS)	155 (-1,16SDS)	✓				Aneuploidía	Ligero acortamiento 4º metacarpiano. Cuello corto. Implantación baja orejas	Variente de Turner
ACH-225	8 a/♀	TB	46,XX	118,1 (-2,1SDS)	169,5 (+1,53SDS)	✓				Negativos	Sin interés	RCCD
ACH-259	8 a/♀	TB	46,XX	116,3 (-1,99SDS)	DND	✓				Negativos	Edad ósea retrasada 2,5 años	¿RCCD?
ACH-264	5 m/♀	TB	46,XX	58,5 (-3,5SDS)	173 (+2,18SDS)	✓				Negativos	CIR.	Probable Silver-Russell
Varios-517	6 a/♀	Retraso mental	46,XX	DND	DND	✓				Duplicación gen <i>SHOX</i>	Hígroma quístico con resolución espontánea. Hernia diafragmática congénita y brida amniótica. Operada. Parada cardiorrespiratoria. Retraso mental. Hipoplasia del cuerpo callos con dilatación ventricular y retraso en la mielinización	Síndrome polimalformativo
ACH-281	7 a/♀	TBF	46,XX	104,8 (-1,4SDS)	155 (-1,16SDS)	✓				Negativos	Padre tratado con HC	Normal
ACH-290	12 a/♀	TB	46,XX	133,9 (-1,66SDS)	154 (-1,35SDS)	✓				Negativos	CIR.	Normal
ACH-307	3 ma/♀	Displasia mesomélica de Langer	NP	47,5	154 (-1,35SDS)	✓	✓	✓		c.508C>G en homocigosis [p. [Ala170Pro]; [Ala170Pro]]	Micromelia rizomélica y mesomélica. Deformidad ambos antebrazos. Consanguinidad. AF+	Displasia mesomélica de Langer.
ACH-316	1 a/♂	TB	46,XY	78 (-2,18SDS)	168 (-1,34SDS)	✓				Negativos	CIR. Pretérmino de 35 semanas.	CIR con adecuada velocidad de crecimiento
ACH-318	2 a/♀	TB	46,XX	82,5 (-2,06SDS)	156 (-0,98SDS)	✓				Negativos	CIR. Déficit de IgA. Hiporexia.	Fallo de medro por CIR e hiporexia
ACH-320	14 a/♂	TB	47,XXY	-2,5SDS	DND					Aneuploidía	Gemelar. Prematuro de 35 semanas. TDAH.	Sd de Klinefelter

De los 25 casos iniciales, se obtuvo un resultado positivo para el gen *SHOX* en 4 casos (16%) consistente en (**figura 4.29**):

- 2 deleciones heterocigotas: del gen *SHOX* y de la región PAR1:
  - ACH-109: Desde la sonda 01341-L06221 a la sonda 06293-L06219 que incluye todo el gen *SHOX* y parte de la región del PAR1.
  - ACH-162: Desde la sonda 01341-L06221 a la sonda 14697-L16348 (MLPA P018-E1) que incluye todo el gen *SHOX* y toda la región PAR1.
- 1 duplicación desde la sonda 01341-L06221 hasta 05645-L05099 que implica a todo el gen *SHOX* y parte de la región PAR1 (Varios-517).
- 1 mutación en homocigosis en el exón 4: c.508G>C; p.Ala170Pro (Sabherwal, 2004a) que confirmó el diagnóstico de displasia mesomélica de Langer (**figura 4.40**).

**Figura 4.40. Mutación en homocigosis c.508G>C de la paciente ACH-307**



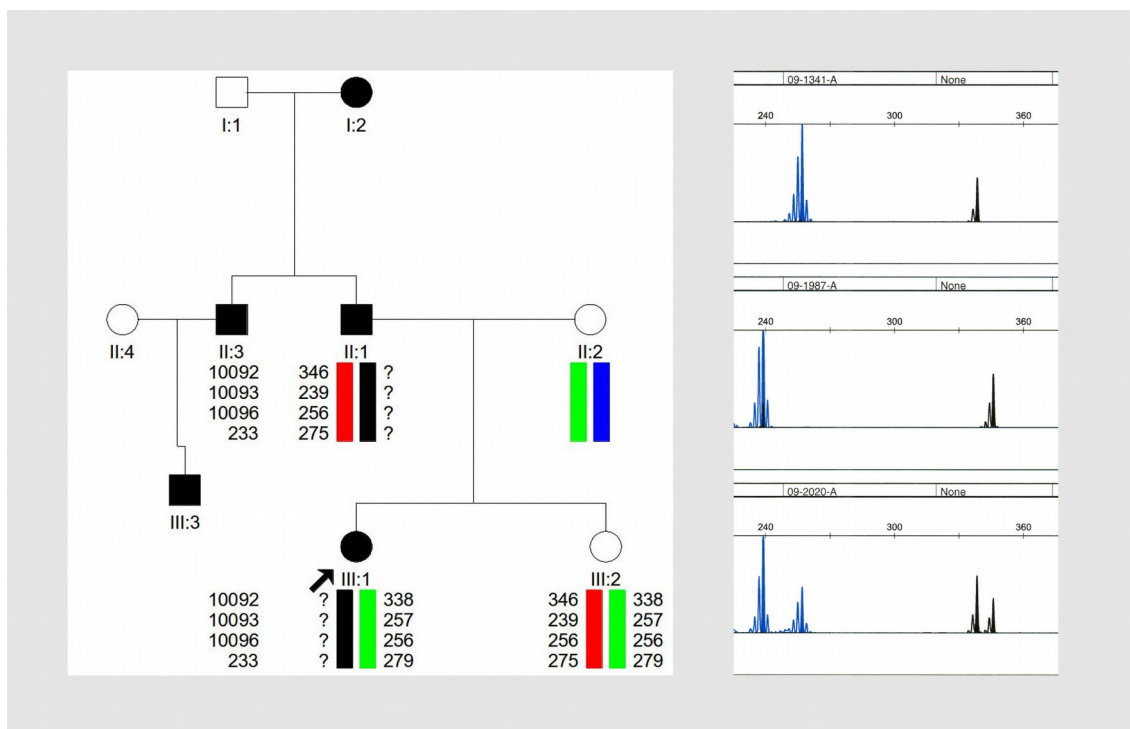
En todos los casos positivos había varios familiares portadores de la alteración con y sin clínica:

- ACH-109: varón de 72 años que ante el hallazgo de una nieta afecta de Madelung (estudio realizado en otro hospital) se solicita estudio del gen *SHOX* en el que se objetiva una deleción heterocigota, por lo que se le diagnostica de afecto de talla baja por haploinsuficiencia del gen *SHOX*. No consta que el paciente tuviese deformidad de Madelung ni que pre-

sentase disarmonía pero sí tiene una talla patológica con 158 cm (-3,1SDS).

- ACH-162: mujer de 29 años que acude a la consulta de Genética Clínica por presentar deformidad de Madelung bilateral, con movilidad reducida, y talla normal. En el árbol genealógico que se realiza en la consulta, la paciente refiere que varios miembros de la rama paterna presentan esta deformidad: su padre, un tío paterno y su hijo y la abuela paterna; aunque en los varones esta deformidad no les ha producido los problemas de movilidad que presenta la paciente. Desea consejo genético reproductivo. Previo al consejo, se solicita estudio del gen *SHOX*. El estudio mediante MLPA objetiva un deleción heterocigota de todo el gen *SHOX* y toda la región PAR1. Tras el resultado, se solicita y se recibe muestra del padre de la paciente y una hermana no afecta. En este segundo estudio, se corrobora que el padre es portador de la misma deleción heterocigota que la *probandus* y su hermana no afecta no la presenta. A pesar de la contradicción aparente, la falsa paternidad quedó descartada. Se realizó el estudio de microsatélites para ver la segregación de la alteración (**figura 4.41**).

**Figura 4.41. ACH-162: Árbol genealógico (izquierda); microsatélites (derecha) DXYS10093 (azul) y DXYS10092 (en negro) en la probandus (superior), padre (centro) y hermana no afecta (inferior)**



- Varios-517: mujer de 6 años que acude a la consulta de Genética Clínica por presentar retraso mental. En el embarazo presentó un higroma quís-

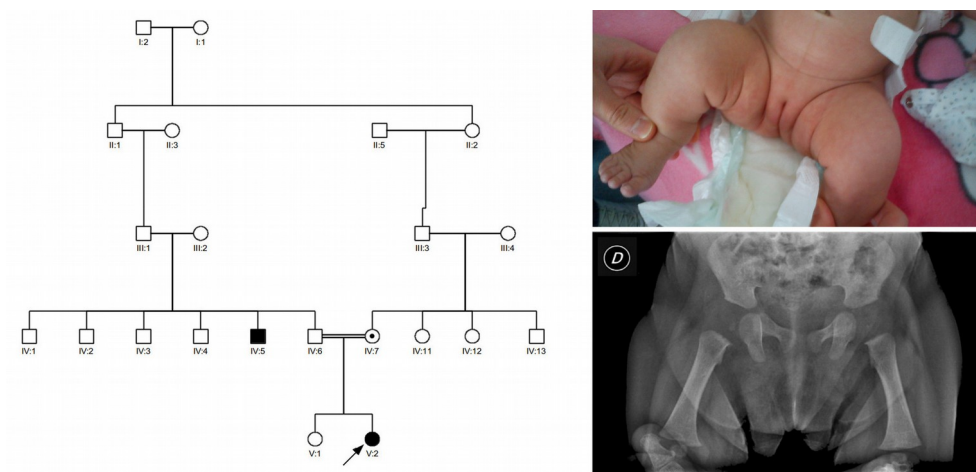
tico que, semanas más tarde, se resolvió espontáneamente. Se realizó amniocentesis por el higroma con resultado de cariotipo femenino normal. A las 33 semanas de gestación presenta un crecimiento intrauterino retardado por lo que se decide realizar una cesárea a las 37+2 semanas. Al nacimiento presenta 2020g y 43cm (P10-25) con perímetro craneal de 33 cm (P50). Presenta una hernia diafragmática, que es operada inmediatamente, y una brida intestinal. En este ingreso tuvo una parada cardio-respiratoria. Desde el principio tuvo retraso psicomotor, con sostén cefálico a los 11 meses. En la resonancia magnética nuclear se observa una hipoplasia del cuerpo calloso con dilatación del sistema ventricular de aspecto colpocefálico y retraso en la mielinización. Presenta talla baja. Se realizó el protocolo de retraso mental, estudio mediante MLPA SALSA P036 y P070 de las regiones subteloméricas de los brazos largos y cortos de todos los cromosomas, obteniéndose una duplicación de la región subtelomérica de los brazos cortos de uno de los cromosomas del par X. Ante este resultado se solicita estudio del gen *SHOX*. El estudio realizado en la paciente y sus progenitores pone de manifiesto que tanto la *probandus* como su padre presentan una duplicación de todo el gen *SHOX* y parte del PAR1. Se desconoce la talla del padre.

- ACH-307: lactante mujer de 3 meses que acude a la Consulta de Pediatría por micromelia. Segunda hija de progenitores de etnia gitana con consanguinidad de segundo grado. En el embarazo, no controlado hasta la semana 32 de gestación, le diagnostican un feto afecto de ACH. Nació a la semana 39 con 3235g de peso, talla 44cm y 35 cm de perímetro craneal con aspecto de micromelia rizomélica. A la exploración en la consulta presentó un peso de 4080g (P10-25), talla 47,5 cm (P3-P10) y PC 38cm (P50) con marcada micromelia rizo-mesomélica y deformidad de los miembros superiores pero no inferiores (**Figura 4.42**). La madre presentaba la deformidad de Madelung en ambos antebrazos y medía 151cm (-1,91SDS), del padre se desconocía la clínica aunque refirió la madre que medía 170cm (-0,99SDS). A la consulta acudió un tío paterno que presentaba talla baja (124,8 cm, -8,94SDS) disarmónica con micromelia rizo-mesomélica, sordera y deformidad de Madelung bilateral. Se realizó escala de Rappold a la *probandus*, a pesar de su corta edad, con el resultado de 10 puntos:
  - Relación braza/talla 80%: 2 puntos.
  - Relación talla sentada/talla 88%: 2 puntos
  - Antebrazo corto: 3 puntos
  - Incurvación antebrazo: 3 puntos



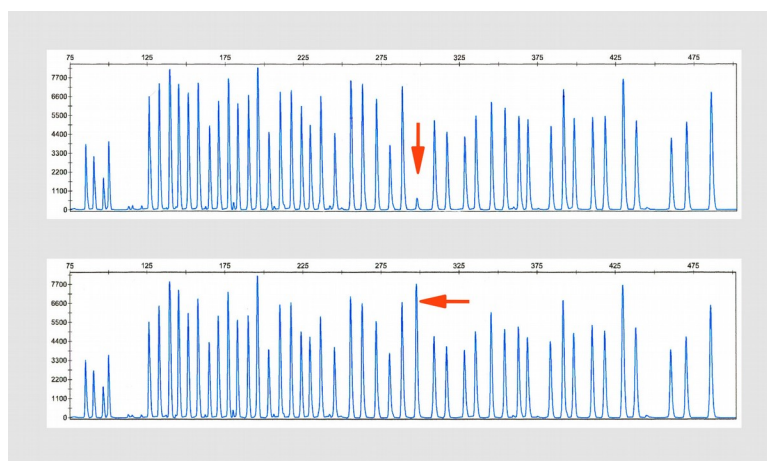
Dada la clínica presentada por la lactante y los antecedentes, se sospecha una displasia mesomélica de Langer (DL). Los progenitores consienten en realizar el estudio a la lactante pero no el estudio de ellos ni de otros miembros familiares.

**Figura 4.42: árbol genealógico de la familia ACH-307. Detalle de miembros inferiores y radiografía de fémures de la probandus**



El estudio mediante MLPA P018-E1 puso de manifiesto una falsa delección en homocigosidad para el exón 4. En las secuencias de estos cebadores para el exón 4 se contempla esta mutación c.508G>C; p.Ala170Pro, por lo que no se produce hibridación y el patrón es de delección en homocigosidad (**figura 4.43**). Con este resultado se secuenció el exón 4 del gen *SHOX* encontrándose la mutación en homocigosidad c.508G>C; p.Ala170Pro descrita por primera vez en una extensa familia de etnia gitana de origen español con elevada consanguinidad entre sí y miembros tanto con diagnóstico de discondrosteosis de Léri-Weill (DLW) como de LD (Sabherwal, 2004a).

**Figura 4.43. Análisis mediante MLPA del caso ACH-307: paciente (superior) y control negativo mujer (inferior)**





Se detectaron 5 casos de aneuploidías:

- *2 variantes de síndrome de Turner*: ACH-118 y ACH-203. Estas dos pacientes presentaban un mosaicismo predominante de una línea 46, XX normal pero otra línea patológica (45,X) que, aunque minoritaria, justifica la baja talla presentada por estas pacientes.
- *2 mosaicismos de aneuploidías del par sexual*:
  - ACH-124: con 3 líneas celulares pero predominante la línea 47,XXX. Es derivada a la consulta de Genética Clínica desde infertilidad por presentar TB para estudio de *SHOX*. Se detectó un patrón patológico consistente en 45,X[7];46,XX[2];47,XXX[91].
  - ACH-177: una niña de 6 años que presentaba talla baja por un mosaicismo de 2 líneas celulares en sangre periférica: una predominante 45,X y otra minoritaria i(Xq).
- *1 síndrome de Klinefelter*

Dieciséis casos de los 20 con cariotipo normal presentan un **estudio negativo**. Los diagnósticos finales de estos casos fueron:

- 4 casos con sospecha de RCCD.
- 1 caso de TBF.
- 4 TBI, 3 de ellos con un componente de TBF y 1 además con RCCD.
- 3 casos con una talla normal-baja y acorde a su talla genética.
- 1 probable síndrome de Silver-Russell en base a los hallazgos clínicos, aunque sin estudio molecular confirmatorio.
- 2 casos con antecedentes de CIR en el embarazo ambos con edades inferiores a 3 años, uno de ellos con adecuada velocidad de crecimiento.
- 1 sin un diagnóstico clínico.

#### 4.3.6.1.5. Grupo HCSC

Este grupo lo constituyen pacientes derivados a la consulta de Genética Clínica desde la consulta de Endocrinología Pediátrica del hospital Clínico San Carlos, por presentar TBI para estudio del gen *SHOX*. La técnica de MLPA para el estudio del gen *SHOX* se implementó en el Hospital Clínico San Carlos en el año 2009. Treinta y un casos hasta el año 2012 fueron estudiados y 3 presentaron alteración en el gen *SHOX* lo que constituye el 9,7% de los casos (**Tabla 4.17**).

Tabla 4.17. Características de los pacientes del grupo HCSC

FAMILIA	EDAD SEXO	TALLA (SDS)	TALLA GENÉTICA	RESULTADO SHOX	CLÍNICA	DIAGNÓSTICO
HCSC-1	16 a/♂	-2,93	165 (-1,87SDS)	Negativo	Sin interés	TBI
HCSC-3	11 a/♀	-1,92	159 (-0,42SDS)	Negativo	Acortamiento de 4º y 5º metacarpianos con pulgares cortos y gruesos. Acortamiento de metatarsianos. AF de talla baja extrema y posible displasia esquelética sin filiar. Fenotipo armónico	TBI
HCSC-5	14 a/♀	-3,84	156 (-0,98SDS)	Negativo	Sin interés	TBI
HCSC-6	12 a/♀	-1,42	158 (-0,61SDS)	Negativo	Prematuro 36 semanas. Doble sistema renal operado	Normal
HCSC-7	13 a/♂	-0,55	160 (-2,74SDS)	Negativo	Sin interés	TBF
HCSC-8	16 a/♂	-1,86	172 (-0,63SDS)	Negativo	Serie osea: fenotipo displásico con asimetría troclear y tórax ancho. Desarrollo puberal completo	Displasia esquelética
<b>HCSC-10</b>	<b>10 a/♀</b>	<b>-3,43</b>	<b>164 (0,42SDS)</b>	<b>Deleción heterocigota</b>	<b>Deformidad de Madelung. Madre tuvo tto con HC</b>	<b>Discondrosteosis de Léri-Weill</b>
HCSC-11	10 a/♂	DND	160 (-2,74SDS)	Negativo	Ecuador. Prematuro 36 semanas. Agenesia renal.	TBF
HCSC-12	8 a/♀	-2,53	160 (-0,32SDS)	Negativo	Pretérmino de 32 semanas. Edad ósea retrasada 2,5 años. A los 11 años desarrolla un cuadro anoréxico	TBI+RCCD
HCSC-13	14 a/♂	-6,21	DND	Negativo	Talla baja armónica extrema. Situación de exclusión social	Sarcoidosis de Bland
HCSC-14	10 a/♂	-2,72	168 (-1,33SDS)	Negativo	Hipotiridismo subclínico	TBI+TBF
HCSC-15	12 a/♀	-1,59	150 (-2,19SDS)	Negativo	Al nacimiento un mes en incubadora por bajo peso por placenta envejecida	TBF
HCSC-16	9 a/♀	-2,84	156 (-0,98SDS)	Negativo	Sin interés	TBI
<b>HCSC-17</b>	<b>8 a/♀</b>	<b>-2,76</b>	<b>152 (-1,72SDS)</b>	<b>Deleción heterocigota</b>	<b>Gran pretérmino de 24 semanas. Trastorno del aprendizaje. Padre sordo secundario a tto antibiótico. AF de talla baja materna.</b>	<b>Alteración SHOX</b>
<b>HCSC-18</b>	<b>13 a/♂</b>	<b>-2,57</b>	<b>164,5 (-1,95SDS)</b>	<b>Duplicación gen SHOX</b>	<b>talla baja armónica. Sobre peso (IMC&gt;P50). A los 16 años, talla baja disarmónica con sobrepeso</b>	<b>Alteración SHOX</b>
HCSC-19	12 a/♀	-1,76	157 (-0,79SDS)	Negativo	Edad ósea acorde	Normal
HCSC-23	14 a/♂	-2,35	167 (-1,51SDS)	Negativo	Talla baja disarmónica. Tronco corto. HCH negativo	Displasia esquelética
HCSC-24	12 a/♂	-2,14	163 (-2,21SDS)	Negativo	Edad ósea acorde	TBI+TBF
HCSC-25	8 a/♀	-2,65	163 (+0,32SDS)	Negativo	Ovodonación. Talla baja disarmónica. RX normal	Displasia esquelética
HCSC-27	11 a/♀	-1,75	161 (-0,05SDS)	Negativo	Sin interés	Normal
HCSC-28	9 a/♀	-1,4	158 (-1,58SDS)	Negativo	TDAH y CI límite	Normal
HCSC-29	11 a/♀	-0,58	154 (-1,35SDS)	Negativo	Sin interés	Normal
HCSC-33	7 a/♀	-3,07	155 (-1,16SDS)	Negativo	Sin interés	TBI
HCSC-35	7 a/♂	-2	169 (-1,25SDS)	Negativo	Sin interés	TBI+TBF
HCSC-36	8 a/♂	-2,25	173 (-0,55SDS)	Negativo	Edad ósea acorde	TBI
HCSC-37	12 a/♂	-2,58	169 (-1,25SDS)	Negativo	Macropene	TBI
HCSC-39	12 a/♀	-2	150 (-2,19SDS)	Negativo	Sin interés	TBF
HCSC-41	12 a/♀	-1,67	161 (-0,05SDS)	Negativo	Prematura de 28 semanas	TBI
HCSC-43	14 a/♂	-1,59	164 (-2,04SDS)	Negativo	Talla baja disarmónica. Edad ósea avanzada	TBF
HCSC-44	11 a/♀	-2	161 (-0,05SDS)	Negativo	Sin interés	TBI
HCSC-45	2 a/♀	-1,21	156 (-0,98SDS)	Negativo	Oligoamnios desde 8º mes sin CIR. A los 4 años se da el alta	Normal

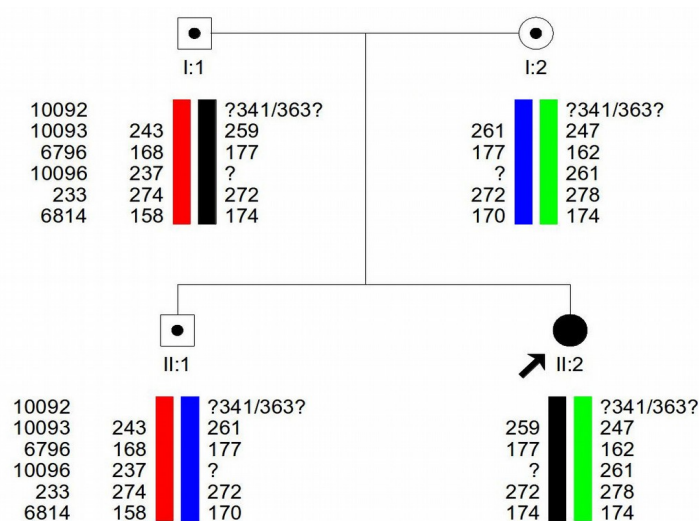
Se realizó estudio de cariotipo en todos los casos con resultado normal. Los casos positivos fueron:

- HCSC-10: niña de 10 años que presenta talla baja patológica -3,43SDS y deformidad de Madelung bilateral. El estudio mediante técnica de MLPA mostró una deleción heterocigota del exón 3. Para descartar la presencia de mutaciones en la secuencia de los cebadores del MLPA, se secuenció todo el exón 3 con el resultado de ausencia de mutaciones, por lo que se consideró el diagnóstico de afecta de discondrosteosis de Léri-Weill. Se

solicitó muestra de los progenitores, ambos con resultado negativo tanto para el MLPA como para la secuenciación, por lo que se considera una mutación *de novo*.

- **HCSC-17:** niña de 8 años que presentaba antecedentes positivos de talla baja en la rama familiar. El estudio mediante MLPA puso de manifiesto que presentaba una delección heterocigota de la sonda 5645-L05099 y la sonda 5646-L15507 ubicados en la región 3' del gen *SHOX*, de la versión P018-E1. El estudio familiar, a sus progenitores y un hermano también en estudio por talla baja en otro hospital, puso de manifiesto que tanto su madre (146cm, -2,83SDS), su padre (170cm, -0,99SDS) como el hermano presentaban la delección en heterocigosis. Al realizar el estudio indirecto con marcadores STR se pudo observar que, efectivamente, cada progenitor tenía la alteración y cada uno le dio un alelo a cada hijo (**Figura 4.44**) La única manifestación que presentaba la familia es la talla baja patológica, y no todos porque el padre tenía una talla normal.

**Figura 4.44. Árbol genealógico de HCSC-17**



- **HCSC-18:** varón de 13 años que acude por talla baja de -2,57SDS y sobrepeso. El estudio mediante MLPA objetivó una duplicación de dos últimas sondas ubicadas en la región 3' del *PAR1*: la sonda 09335-L15508 y 14697-L16348, de la SALSA P018-E1. El estudio de los progenitores puso de manifiesto que era el padre el portador de la duplicación, que presentaba una talla final de -3,01SDS. En un principio presentaba un fenotipo armónico pero actualmente, con 16 años, presenta una talla baja patológica (-2,85SDS) con disarmonía por acortamiento de miembros inferiores.

En este grupo hubo 2 familias en las que se encontró una delección heterocigota en la sonda 5647-L05101 con las SALSA P018-D1: en la familia HCSC-1, que también se encontró en la madre, y en la familia HCSC-7. En ambos casos, el patrón encontrado con la SALS P018-E1 fue normal.

Veintiocho casos presentaron un **resultado negativo**. El diagnóstico probable en estos casos fue:

- 13 TBI, 1 caso con componente de TBF y 1 caso más con RCCD.
- 6 casos en los que se consideró que la talla que iban a alcanzar estaba dentro de los valores de la talla genética.
- 5 TBF.
- 3 displasias esqueléticas sin filiar, en los 3 casos con una disarmonía evidente.
- 1 caso de un paciente afecto de sarcoidosis de Blau con estudio molecular confirmatorio con una mutación en heterocigosis p.Arg334Gln en el gen *NOD2/CARD15* (16q12, MIM605956), *de novo* en él. La talla baja no es un signo de esta enfermedad.

Una característica de este grupo es que, en general, la edad de los pacientes es más alta que la del resto de los grupos lo que ha permitido descartar los casos sospechosos de RCCD. Así el grupo más predominante es precisamente el de las tallas bajas idiopáticas. Le siguen 6 casos en los que se espera un valor final de talla acorde con lo esperado en su talla diana y 5 casos con diagnóstico de TBF.

#### **4.3.6.2. Resultados del control de calidad EMQN**

Se realizaron los controles de calidad de EMQN de los años 2011-12, 2012-13 y 2013-14. En todos se dio la máxima puntuación. En la **tabla 4.18** se muestran los casos con los resultados.

De esta forma quedan validadas nuestras técnicas, la capacidad de detectar alteraciones y los informes realizados.

**Tabla 4.18. Exámenes y resultados obtenidos del control de calidad EMQN de los años 2011 a 2013**

		EMQN 2011-12		
		CASO 1	CASO 2	CASO 3
Técnica		MLPA	MLPA	MLPA
Alteración		Deleción heterocigota 09337-L00911 a 13296-L1536	Normal	Normal
Resultado (sobre 2)	Genotipo	2	2	2
	Interpretación	2	2	2
	Informe	2	2	2
Comentario		Nomenclatura HGVS: c.634-? _*877+146,2kb+?(p.?)		

		EMQN 2012-13		
		Caso 1	Caso 2	Caso 3
Técnica		MLPA	Secuenciación	MLPA
Alteración		Deleción heterocigota 00148-L15501 a 05648-L06218. HGVS: c.487-? (p?)	Doble heterocigoto c.457C>T; p.Arg153Cys y c.487G>T; p.Val63Phe	Normal
Resultado (sobre 2)	Genotipo	Anulado	1,5	1,75
	Interpretación	Anulado	2	1,75
	Informe	Anulado	2	2
Comentario		Utilizar nomenclatura HGVS		
		Falta referencia de versión MLPA y actualizar cita bibliográfica		

		EMQN 2013-14		
		Caso 1	Caso 2	Caso 3
Técnica		MLPA	MLPA+secuenciación	Secuenciación
Alteración		Deleción heterocigota 01341-L20561 a 05679-L20176	Deleción heterocigota MLPA+mutación heterocigota 01148-L115501 c.[508G>C;=] p.[Ala170Prp;=]	Negativo
Resultado (sobre 2)	Genotipo	1,75	1,75	1,75
	Interpretación	1,5	1,5	2
	Informe	2	2	2
Comentario		No ofertar prenatal. Error en la delimitación de la deleción	Falso positivo deleción exón 4. No ofertar más estudios	



## **5. discusión**





## 5. Discusión

### 5.1. RESTOS ABORTIVOS

#### 5.1.1. Resultados positivos

Se obtuvieron 4 displasias tanatofóricas tipo II y 2 displasias tanatofóricas tipo I de las 29 muestras abortivas recogidas. Esta frecuencia es inversa a la encontrada en la bibliografía, donde la DT-I es más frecuente que la DT-II (Noel, 2014; Xue, 2014). Podría explicarse porque la DT-II, con una craneosinostosis evidente, es más fácilmente identificable con su consiguiente solicitud de estudio.

Dado el bajo número de necropsias realizadas, nuestra discusión se va a basar en las alteraciones ecográficas encontradas prenatalmente. Las semanas de gestación de los 6 casos positivos están dentro de las semanas de realización de la ecografía del 2º trimestre, como lo encontrado en la bibliografía (Parrilla, 2003; Krakow, 2008; Schramm, 2009; Yeh, 2011).

La aportación de los datos clínicos es fundamental para poder realizar una adecuada orientación del diagnóstico molecular. En nuestra serie de 6 abortos, sólo en 5 se describía la clínica y en estos 5 parece haber un patrón mínimo común para la DT-II consistente en una marcada micromelia junto a alteración craneal. Sin embargo, a pesar de este patrón mínimo, sólo en 2 de los 5 abortos con clínica se objetiva una hipoplasia de tórax y sólo en 1 de los 6 casos, el facultativo sospechó una displasia ósea letal (caso ACH-122). En la bibliografía están ampliamente descritos una serie de parámetros ecográficos que pueden orientar hacia una displasia letal con altas sensibilidades:

- Un valor menor de 0,16 para la ratio longitud fémur/circunferencia abdominal es un indicador fiable independientemente de la edad gestacional (Rahemtullah, 1997; Ramus, 1998). Parrilla y col. consiguieron un 100% de sensibilidad en letalidad si a un valor  $<0,16$  LF/CA se sumaba una micromelia y/o fémures curvos y/o múltiples fracturas (Parrilla, 2003).
- La longitud femoral  $<P5$  pero con una desviación estándar entre 2 ó 3 unidades, tienen mejor pronóstico que aquellas con una desviación estándar superior a 4 (Winter, 2012). Un fémur corto moderado sería indicativo de afectación ACH o HCH y uno severo (entre 30-80% menos de la longitud normal) indicaría una displasia tanatofórica (Goncalves, 1994).
- Una circunferencia torácica  $<P5$  es muy sugerente de displasias esqueléticas letales, como quedó demostrado en una serie de casos prenatales

en los que 37 de 40 casos de displasia esquelética letales, presentaban un valor <P5 (Schramm, 2009).

En ninguno de nuestros casos de restos abortivos positivos tenemos medidas ecográficas exactas ni de fémur ni de circunferencia abdominal ni torácica que nos permita comparar estos resultados publicados con los nuestros. Sí que en los 5 casos positivos con clínica se indica micromelia o fémur corto pero sin indicar gravedad del mismo mediante desviaciones estándar.

Entre los 10 casos positivos, tenemos una cromosomopatía comprobada:

- ACH-107: aborto de 21 semanas de gestación que presentaba CIR, hipoplasia torácica, cardiopatía y agenesia de cuerpo calloso (**figura 4.2; pág. 84**). De estos cuatro síntomas, la hipoplasia torácica y el CIR solapan con las alteraciones en el gen *FGFR3*. El cariotipo objetivó la presencia de una triploidía 69,XXY.

En nuestro caso, sería interesante saber cómo estaba la placenta. Es de suponer que al no recalcar dentro de los signos fetales una placenta anómala, típicamente hidatiforme o molar, es porque ésta era normal. Ante una placenta normal y un feto de estas características podríamos suponer que se trata de una triploidía digínica, resultado de la fecundación de un óvulo con una dotación completa 2n por un espermatozoide haploide (n). Estas triploidías se caracterizan por placentas pequeñas no molares, con CIR asimétrico, marcada desproporción cabeza-cuerpo y cabeza alargada (McKinlay-Gardner, 2004), que pudiera confundirse con una displasia esquelética.

Algo más del 35% de los abortos son debidos a aneuploidías, así como un 4% de los recién nacidos muertos y un 0,3% de los vivos (Hassold, 1996). Se estima que el 99% de las triploidías se pierden antes de la semana 16 de gestación (McKinlay-Gardner, 2004) con una prevalencia en el primer trimestre (semanas 11 a 14 de gestación) entre 1 en 1523 a 3270 gestaciones (Jauniaux, 1997; Yaron, 2004; Salomon, 2005). En el estudio de Wellesley y col. la prevalencia de triploidías era de 1,26 por 10.000 nacimientos de los cuales el 92% era detectado prenatalmente y sólo un 5% sobrevivió hasta el nacimiento (Wellesley, 2012).

Del estudio de Todros se destaca que, dentro de las anomalías fetales, el 19% de los fémures cortos son aneuploidías que presentan un tamaño de fémur por debajo de P<10 aunque no tan severo como las displasias esqueléticas (Todros, 2004). El estudio de Mathiesen de datos recogidos durante 3 años indica que un fémur corto, <P5, es muy indicativo de cromosomopatías, seguido de fetos pequeños para su edad gestacional (SGA) cuando presenta un cariotipo fetal normal (Mathiesen, 2014).

Por lo tanto, el estudio de los cromosomas fetales, bien sea por cariotipo, bien por cualquier técnica molecular que dé la mayor información posible de todos los cromosomas, está justificado ante cualquier patología fetal esquelética. De hecho están descritos distintos casos concomitantes de trisomía 21 con displasia tanatofórica tipo I (Yamada, 2009), hipochondroplasia (Dumic, 2011), acondroplasia (de Azevedo-Moreira, 2010) e incluso diagnosticados de forma prenatal (Kaga, 2014) que dificultan el diagnóstico de ambas por la interacción de las distintas clínicas. Y no sólo de la trisomía 21, también de otras aneuploidías como el síndrome de Klinefelter junto a la mutación p.Gly380Arg con seis casos descritos en la bibliografía (Ros-Pérez, 2012), con lo cual el cariotipo tiene que estar contemplado en el estudio de una patología fetal.

Un 27,6% de los abortos presentaron o mutaciones en el gen *FGFR3* o el cariotipo patológico.

La necropsia y la recogida de fotografías y radiologías de los fetos recibidos permitió la ampliación del estudio molecular, tras resultado negativo para el gen *FGFR3*, en los siguientes casos:

- ACH-57: aborto de 23 semanas con necropsia sugerente de feto afecto de síndrome de Edwards que no se pudo confirmar por material fetal degradado. La solicitud del facultativo era de ACH. De nuevo, se observa la necesidad del estudio del cariotipo fetal ante una patología fetal.
- ACH-71: un feto con necropsia sugerente de síndrome de Apert que se confirmó molecularmente con la presencia de la mutación en heterocigosis c.758C>G; p.Pro253Arg en el gen *FGFR2* (Wilkie, 1995).
- ACH-121: este feto presentaba miembros inferiores cortos con fémur y tibias curvos (**figura 4.2; pág. 84**). Esta clínica sí solapa con la de displasias tanatofóricas, aunque la presencia de tibias curvas no es característica. Tras el estudio negativo tanto de cariotipo como de los exones 7, 9, 12, 13, 14 y 18 del gen *FGFR3*, así como de las regiones subteloméricas de los brazos cortos y largos de todos los cromosomas realizado por la sección de Citogenética, se revisó el caso desde el origen de la petición (Toledo). Tras una nueva reevaluación se dirigió el estudio molecular hacia una osteogénesis imperfecta. Este estudio y diagnóstico final fue diseñado y realizado por la Dra Mónica Martínez García (Martínez-García M, 2013, tesis doctoral). Se identificó una mutación *de novo* en heterocigosis p.Gly857Ser en el exón 38 del gen *COL1A1* que confirmó el diagnóstico de osteogénesis imperfecta y lo tipificó como tipo II.
- ACH-207: este feto presentó en la ecografía de la 20 semana una disminución del ángulo fronto-nasal con discreto abombamiento frontal, tórax acortado y deprimido, micromelia con rizomelia, húmero y fémur curvos

y polidactilia en ambas manos con desviación cubital de las mismas (**figura 4.2; pág. 84**). La sospecha clínica era de acondroplasia aunque se realizó tanto el estudio cromosómico (por QF-PCR por no progresión del cultivo) como de los exones 7,9,12,13,14 y 18 del gen *FGFR3*. Todos los estudios fueron negativos. La polidactilia no es una característica ni de acondroplasia ni de displasias tanatofóricas. La necropsia del feto realizada por el Dr. Santonja, Servicio de Anatomía patológica de la FJD, sugirió un síndrome de Ellis van Creveld. Este diseño y diagnóstico fue realizado por la Dra Mónica Martínez García (Martínez-García M, 2013, tesis doctoral). Se identificaron dos mutaciones en heterocigosis en el gen *ECV2*: p.Trp215\* en el exón 5 heredada de la madre, y la p.Arg677\* en el exón 13 heredada del padre (Peraíta-Ezcurra, 2012; Martínez-García, 2013).

### 5.1.2. Resultados negativos

Dieciséis casos presentaron un resultado negativo. El caso ACH-61 era un feto que presentaba CIR severo, cráneo en trébol, hipoplasia torácica y rizomelia, en el que se esperaba un resultado positivo para displasia tanatofórica tipo II. Sin embargo resultó negativo. Hoy en día sólo se ha descrito 1 mutación para la displasia tanatofórica tipo II: c.1948A>G; p.Lys650Glu descrita por Tavormina (1995a)). Ante un resultado negativo para esta mutación, se descartaron todas aquellas descritas para la displasia tanatofórica tipo I, que cubren un 60% de los casos (Horton, 1983) y un 100% según la serie (Xue, 2014). En esta cohorte de Xue se estudian 324 casos de pacientes con diagnóstico clínico (que incluía radiología y estudio anatomopatológico) de las distintas alteraciones en *FGFR3*, entre las que se encuentran 173 casos con displasia tanatofórica tipo I y 31 con tipo II. Fueron capaces de detectar el 100% de las mutaciones para las formas TD-I con el estudio de los codones 248, 249, 370, 373, 650 y 807; y para la TD-II con la mutación p.Lys650Glu, todos estos codones contemplados en la metodología de esta tesis. El caso ACH-61 a pesar de ser muy sugerente de un TD-II, parece poco probable que lo sea. Aunque no estaba descrito como tal, dada las semanas de gestación indicadas en el informe, 37 semanas, debía ser un mortinato o feto cruz. En esas fechas todavía no estaba instaurada la posibilidad de realizar estudio radiológico y fotográfico en los abortos recibidos en el servicio de Genética, como tampoco consta la realización de una necropsia, por lo que no pudo continuarse con otros diagnósticos diferenciales.

Entre 12 de los 16 casos negativos se indicaba la clínica presentada por el feto. Nueve de ellos indicaban la presencia de alteración en miembros, normalmente micromelia o fémur corto, algunos como único signo fetal. La detección de un fémur corto, por debajo de P10, en la ecografía de 2ºTM es siempre un dilema muy recurrente en la bibliografía. Uno de los primeros estudios fue el realizado por Todros en 2004 donde se analizan los 86 casos de fetos con fémur

corto, de las 1.028 ecografías realizadas en 4 años de estudio, con el seguimiento desde su detección hasta el final del embarazo. De estos 86 fetos:

- 28 (32,4%) resultaron ser normales en los que más de la mitad consiguieron una longitud de fémur por encima del P10 en las últimas semanas del embarazo.
- 18 fetos (21%) presentaban una talla baja para su edad gestacional o SGA (de sus siglas en inglés: *small-for-gestational age*), más de la mitad con el doppler anormal que indicaba que el SGA tenía origen en una anómala vascularización.
- 40 (46,5%) presentaban anomalía fetal, entre las que se encontraban:
  - 16 aneuploidías
  - 13 displasias esqueléticas: 4 displasias tanatofóricas sin especificar, 4 ACH, 1 osteogénesis imperfecta tipo II, 3 pies zambos bilaterales y 1 unilateral (que al final del embarazo alcanzó un fémur >P10)
  - 11 casos sin displasias esqueléticas ni aneuploidías

Las conclusiones a las que llegan es que, ante un fémur con <P10, se requieren estudios adicionales ya que cerca del 50% son indicativos de alteración fetal. Estos estudios adicionales tienen fácil acceso porque consisten en la realización de un cariotipo y, ante un resultado negativo para el cariotipo, el estudio del gen *FGFR3* como mínimo, ya que permiten descartar el mayor número de displasias esqueléticas prenatales encontradas. O lo que es lo mismo, ante un resultado negativo para el cariotipo y el gen *FGFR3*, las posibilidades de afectación fetal esquelética grave disminuyen a menos del 20%. Esta situación queda reflejada en las 5 necropsias realizadas en nuestra serie, donde en 4 se descarta afectación tipo osteocondrodisplásica y la 5ª sugiere una cromosomopatía (trisomía +18 o síndrome de Edwards). Sin embargo constatamos el bajo número de necropsias realizadas.

La bibliografía indica que un fémur corto aislado era indicativo, cuando no resultaba ser normal, de SGA o CIR o Doppler umbilical anómalo, sin encontrar en las distintas series publicadas ni cromosomopatías, ni displasias esqueléticas asociadas a ese aislado fémur corto (Papageorghiu, 2008; Morales-Roselló, 2012; Vermeer 2013). La diferencia con el estudio de Todrós es que en este último se estudia qué podemos esperar de un feto que, al menos, presenta fémur corto, independientemente de otras alteraciones estructurales (sonolusencia nuchal aumentada, hipoplásia torácica, fémur curvo, pies zambos, etc.) y los otros estudios hablan de que un fémur corto aislado, es decir, cuando se han descartado otras alteraciones estructurales fetales, es indicativo de SGA, CIR o Doppler umbilical anómalo.

En 26 de los 29 casos (89,9%) de nuestra serie las alteraciones óseas se objetivan entre las semanas de gestación 16 a 23, que es el periodo en el cual se realiza la ecografía de segundo trimestre. Estas semanas de detección están en consonancia con la bibliografía (Parrilla, 2003; Krakow, 2008; Schramm, 2009; Yeh, 2011). De los 3 casos que se salen de esta franja de semanas, el caso ACH-37 es el único caso francamente llamativo por la precocidad en la detección de una alteración ósea (12 semanas de gestación). La clínica del feto no venía aportada más allá de la micromelia sin datos de los progenitores ni necropsia del feto. Sólo con este dato de micromelia a la semana 12 nos parece poca justificación para estudio del gen *FGFR3* porque hasta la semana 12 de gestación no se produce la osificación de los huesos largos por lo que es difícil su estudio e interpretación (Noel, 2014). En esas semanas se requiere de un seguimiento y una ecografía más exhaustiva en la semana 16 para descartar otras alteraciones fetales y confirmar o descartar esa micromelia. La ausencia de datos clínicos no permite aportar alternativas diagnósticas ante un resultado negativo del gen solicitado y limitan la capacidad de actuación por parte del laboratorio.

En el diagnóstico diferencial de las displasias tanatofóricas hay que contemplar:

1. La displasia torácica axfisante o síndrome de Juene, es una enfermedad rara autosómica recesiva que presenta tórax estrecho con costillas cortas y micromelia de brazos y piernas. También puede asociar polidactilia, y alteraciones pélvicas así como alteraciones en otros sistemas (particularmente el riñón). La mayoría de los individuos fallecen en la infancia aunque hay variantes que permiten alcanzar la adolescencia e incluso la edad adulta. El caso ACH-22 en el que se indicaba un feto con hipoplasia torácica recidivante (segundo feto de esa pareja) podría ser candidato a esta patología.
2. La acondrogénesis tipo 1B se caracteriza por acortamiento extremo de miembros, hipoplasia de tórax, abdomen protuberante y apariencia de feto hidrópico por la abundancia de piel en una estructura ósea tan pequeña. Suele presentar fracturas en las costillas y ausencia de osificación de los pedúnculos vertebrales, signos clínicos que le diferencia de las displasias tanatofóricas. Es una condición fatal debido a mutaciones en el gen *SLC26A2*.
3. La fibrocondrogénesis es una rara condrodisplasia rizomélica letal con probable herencia autosómica recesiva. Los fetos presentan enanismo con hipoplasia torácica y costillas cortas, signos que solapan con las displasias tanatofóricas. Sin embargo tiene como característica radiológica el ensanchamiento y desflecado de las metáfisis, con la porción media de la cara plana, nariz y boca pequeñas, micrognatia y lengua bífida.



4. La atelosteogénesis es una rara condrodisplasia letal caracterizada por hipoplasia distal de húmero y fémur, entre otros huesos, así como hipoplasia torácica. La histiopatología del hueso se caracteriza por múltiples condrocitos degenerados encapsulados en el tejido fibroso lo que da aspecto de una condrodisplasia de células gigantes. Existen tres tipos distintos con gravedades diferentes.
5. Los síndromes *short rib-polydactyly* que presentan acortamiento de miembros con tórax estrecho con o sin polidactilia. Existen cuatro subtipos todos con herencia autosómica dominante.
6. La displasia dissegmentales tipo Silvermanandmaker, que es un desorden letal que presenta tórax estrecho, cuello corto, baja estatura, y huesos curvos con irregular osificación de los cuerpos vertebrales. Todos ellos signos que pueden solapar con las displasias tanatofóricas. Sin embargo es común la presencia de onfalocelo y paladar hendido que no aparece en las tanatofóricas.
7. SADDAN: ya nombrada anteriormente, se caracteriza por talla baja extrema, con una caja torácica muy estrecha, tibias curvas, retraso mental profundo y *acanthosis nigricans*. Hasta la fecha es debido a dos mutaciones descritas en el nucleótido 1.949 del gen *FGFR3*, codon 650. En el estudio de mutaciones frecuentes para displasia tanatofórica está contemplado el estudio del codon 650 por lo que queda descartado en los estudios negativos para el gen *FGFR3*.

### 5.1.3. Asesoramiento genético

Ante la presencia de un feto afecto de displasia tanatofórica es necesaria la realización de un asesoramiento genético a la pareja con carácter reproductivo. Ante una interrupción del embarazo o pérdida del mismo en gestaciones avanzadas, es recomendable tanto la realización de la necropsia como de radiografías y fotos al feto para posibles diagnósticos diferenciales (Trujillo-Tiebas, 2009).

Las mutaciones en el gen *FGFR3* causantes de displasias esqueléticas presentan todas un carácter dominante y una penetrancia completa. La recurrencias de fetos con displasia tanatofórica en una misma pareja no está descrita hasta la fecha. En la bibliografía se encuentra un artículo de 1996 con un riesgo de recurrencia de 0,2%, obtenido de las enfermedades recesivas o las formas poligénicas de transmisión (Guu, 1996). Pero como bien se explica en ese artículo, el mecanismo no era conocido en ese momento. En 1995, Tavormina y Rousseau describen molecularmente los primeros casos de displasias tanatofóricas donde se demostró que era una mutación *de novo* con carácter dominante (Rousseau, 1995; Tavormina, 1995). Desde entonces no se han descrito parejas que presenten dos embarazos con feto afecto de displasia tanatofórica de ninguno de los

dos tipos, es decir, no está descrito el mosaicismo germinal. Este dato es importante para transmitir la casi nula posibilidad de una nueva gestación afecta. Sin embargo, a pesar de una probabilidad de repetir el mismo evento en otra gestación tan baja, la ansiedad que produce en la pareja ante un nuevo embarazo suele ser de tal magnitud que se solicita una técnica invasiva en la nueva gestación, asumiendo el riesgo de pérdida fetal que ésta conlleva.

Una nueva posibilidad de diagnóstico prenatal con un futuro prometedor es el ADN fetal en sangre materna. Esta nueva técnica no invasiva está bien desarrollada cuando el afecto con mutación conocida es el padre, o es *de novo* en el feto y el estudio va dirigido a buscar esa mutación en el ADN fetal en una gestante no afecta, a partir de la semana 8 de gestación (Bustamante-Aragón, 2010). De esta forma se puede realizar la prueba en una nueva gestación acortando la ansiedad materna.

Aunque no esté descrito el mosaicismo germinal, sí está descrito el mosaicismo somático. Es el caso de una mujer que presentaba la mutación Arg248Cys en el 25% de los linfocitos estudiados, con clínica de talla baja desproporcionada, dislocación de la cabeza del radio, *coxa vara*, incurvación de alguno de los huesos largos con una deformidad del húmero y *achantosis nigricans* (Hyland, 2003). La paciente tuvo una gestación con un feto que presentaba una displasia ósea letal con enanismo e hipoplasia pulmonar, muy sugerente de displasia tanatofórica que no fue confirmado molecularmente, lo que sugiere que esta paciente presentaba tanto mosaicismo somático como germinal.

En aquellos casos en los que el estudio del gen *FGFR3* indicados como primera línea de trabajo sean negativos, la obtención de suficiente material fetal así como de la información clínica de la necropsia, radiología y fotos permite una nueva evaluación para el estudio de nuevos genes candidatos. En nuestra serie tenemos 2 casos:

ACH-121: la reevaluación de este feto con diagnóstico de displasia ósea dirigió el estudio y su confirmación molecular a feto afecto de osteogénesis imperfecta tipo 2 por una mutación *de novo* en heterocigosis p.Gly587Ser en el gen *COL1A1*. Seis meses más tarde la mujer vuelve a quedar embarazada. Ante el bajo riesgo de recurrencia y por la posibilidad de la pérdida fetal, decidió no someterse a ninguna prueba invasiva y a la semana 20 se detectó feto varón sin alteraciones, como así se confirmó al nacimiento.

ACH-207: tras el resultado negativo de *FGFR3* por la solicitud del facultativo de ACH, el estudio anatomopatológico del feto indicó la sospecha de síndrome de Ellis van Creveld, que se confirmó con la objetivación de dos mutaciones en heterocigosis en el gen *EVC2*: la p.Trp215\*, de origen materno, y la p.Arg677\*, de origen paterno. Gracias a este diagnóstico confirmatorio se pudo realizar un diagnóstico prenatal no invasivo al quedar embarazada un año más tarde la ges-

tante en el que no se amplificaba la mutación paterna. La técnica invasiva temprana realizada a las 11 semanas de gestación puso de manifiesto un feto varón portador de la mutación materna (Peraíta-Ezcurra, 2012).

## 5.2. ESTUDIOS PRENATALES

### 5.2.1. Gen *FGFR3*

Se discuten los casos según la agrupación propuesta.

#### 5.2.1.1 Alteraciones en la gestación en curso

##### 5.2.1.1.1. Resultados prenatales positivos para el gen *FGFR3*

El número de estudios prenatales del segundo periodo (2007-2012) es superior al primero probablemente debido a que el diagnóstico prenatal de displasias esqueléticas es más accesible, fiable y rápido frente a los años iniciales, esperándose a este resultado antes de una posible interrupción del embarazo.

Once casos fueron positivos con mutaciones en el gen *FGFR3*: 6 displasias tanatofóricas tipo I y 1 displasia tanatofórica tipo II. A diferencia de los restos abortivos, el tipo I dentro de las displasia tanatofóricas fue más frecuente que el tipo II. Teniendo en cuenta que en las muestras del apartado anterior también han sido detectadas ecográficamente, el cómputo total sería de 13 displasias tanatofóricas, de las cuales 7 son del tipo I y 6 del tipo II. Este cómputo general sí está dentro de lo observado en la bibliografía pero no sabemos explicar por qué esa diferencia encontrada en los restos abortivos (Noel, 2014).

De los 7 casos de DT-I, la mutación más frecuente fue la p.Arg248Cys (75%) seguida por p.Ser249Cys (12,5%) y de p.Tyr373Cys (12,5%). Estas frecuencias son similares a la serie de Xue y col. donde en 173 casos de DT-I la mutación más frecuente fue la p.Arg248Cys (66,5%), seguida de la p.Tyr373Cys (23,7%); la p.\*807 (6,9%); la p.Ser249Cys (6,4%), la p.Gly370Cys (2,3%) y por último la p.Lys650Met (1,2%) (Xue, 2014).

Al igual que ocurría en los abortos, las semanas de gestación de las 7 displasias tanatofóricas positivas están entre la 15 y la 22, cuando se realizan las ecografías de segundo trimestre, y son las descritas en la bibliografía (Parrilla, 2003; Krakow, 2008; Schramm, 2009; Yeh, 2011).

La detección de los fetos afectados de ACH se produjeron a partir de la semana 27 de gestación, acorde con lo descrito en la bibliografía donde mayoritariamente los fetos afectados de ACH se observan en el 3<sup>er</sup> trimestre (Cordone, 1993). La única que difiere es la familia ACH-236 con una semana de detección temprana: 21. La experiencia del facultativo ecografista es determinante en este punto para saber, ante un feto con displasia ósea, si ésta es letal o no y orientar el

diagnóstico. En este caso el ecografista sugirió el estudio de ACH confirmándose molecularmente.

A diferencia de lo encontrado en las muestras de restos abortivos, los 5 casos de los 7 positivos para displasia tanatofórica que aportan clínica, presentaban rizomelia e hipoplasia de tórax. Además en la tipo II, ACH-31, indicaba que el fémur era recto y que el cráneo presentaba forma en hoja de trébol, signos característicos de este tipo de displasia tanatofórica. En todos ellos la solicitud fue directamente de displasia tanatofórica. En los 2 casos que no se aporta clínica, 1 también se indicaba displasia tanatofórica y otro sólo rizomelia. Por tanto, excepto en este último caso (ACH-308) en el que sólo se detecta rizomelia, en el resto de los casos el diagnóstico ecográfico de forma letal fue certero y el estudio dirigido a las formas letales de las mutaciones en *FGFR3*.

Entre los 44 casos recogidos, 7 de ellos no aportan la clínica presentada por el feto entre los cuales se encuentran 2 con resultado positivo para TD-I. De los 37 restantes, hay 8 casos en los que se indica la presencia de hipoplasia torácica junto a micromelia y de estos 8, 5 dieron positivo para *FGFR3*, es decir, ante un feto con estas características, en nuestra serie, presenta un 60% de ser un forma letal de displasia tanatofórica.

Las 4 muestras afectas de ACH presentaban rizomelia sin hipoplasia torácica. En uno de ellos, además, se indicaba la dismorfia facial característica de la ACH: frente abombada con puente nasal deprimido. Exceptuando la ACH-236 que indicaba micromelia y solicitaba estudio de displasia ósea, las otras 3 indicaban estudio de ACH. Probablemente las tempranas semanas de detección (21 semanas del caso ACH-236) no permitían afinar más en la clínica.

Tres casos presentaron un cariotipo patológico: dos con repercusión en el fenotipo del feto, ACH-129 y ACH-208, y otra aparentemente sin repercusión en el fenotipo, ACH-193. Estas alteraciones encontradas fueron:

- ACH-129: no se tienen datos de la ecografía ni tampoco edad materna ni semanas de gestación, pero al ser un líquido amniótico podemos decir que al menos las semanas de gestación eran 15. La única indicación era la de fémur corto con solicitud de estudio de aneuploidía seguido de ACH. El resultado fue de 47,XY+21, compatible con síndrome de Down, que es la aneuploidía más frecuente (Hassold, 1996). En este caso nos parece que el orden de la solicitud fue acertada: estudio de cariotipo fetal seguido de mutaciones en el gen *FGFR3*. Sólo con el dato de fémur corto, sin indicar la desviación estándar o percentil, o si es un signo aislado o asociado a otras patologías no indicadas, es difícil comparar con los estudios arriba discutidos de fémur corto (Todros, 2004; Vermeer, 2013; Mathiesen, 2014).

- ACH-193: primigesta de 40 años, con hipotiroidismo en tratamiento y diabetes gestacional, en seguimiento por CIR de dos semanas de retraso, tres teniendo en cuenta la longitud del fémur. A las 30 semanas de gestación se realizó una amniocentesis. El cariotipo fue de un varón que presentaba una translocación *de novo* entre el brazo corto del cromosoma 3 y el largo del cromosoma 8 [46,XY(3;8)(p23;q11.2)]. Con este resultado, a los progenitores se les dio un consejo genético indicando que la translocación era aparentemente balanceada con un riesgo del 6,1% de presentar anomalías al nacimiento (Warburton, 1991). A las 32 semanas se le realiza una cesárea y nace un varón de 1.065 g que ingresa en neonatología por bajo peso y enterocolitis. No se refiere ninguna alteración neonatal.
- ACH-208: es una muestra obtenida por vellosidad corial a la semana 12 de gestación de una paciente de 41 años cuyo feto presentaba una sonolusencia de 3,7 mm y micromelia. A pesar de no tener el resultado de cribado de primer trimestre, ante una sonolusencia positiva en una gestante de 41 años, era esperable que el cribado fuese de alto riesgo por lo que la indicación primera debería ser de estudio de aneuploidía. Sin embargo, la indicación del facultativo fue de displasia ósea. El resultado del cariotipo fue de un varón en mosaicismo con una línea patológica consistente en un isocromosoma de brazos cortos del cromosoma 12, compatible con un síndrome de Pallister-Killian (**Figura 4,7; pág 91**). El Síndrome de Pallister-Killian es un síndrome raro con múltiples anomalías que incluyen retraso mental grave, hipotonía, defectos diafragmáticos y anales, cardiacos, sordera y crisis convulsivas. Suelen presentar acortamiento rizomélico, manos y pies pequeños con hipoplasia de las uñas y dismorfia facial.

Los cariotipos patológicos junto a las mutaciones en el *FGFR3* constituyen el 29,5% de los casos positivos.

#### **5.2.1.1.1.1. El diagnóstico prenatal no invasivo**

El estudio de la mutación familiar en el feto se realiza, mayoritariamente, mediante técnicas invasivas prenatales que tienen un riesgo de pérdida fetal asociado bajo pero significativo: realizado por personas con experiencia es de 1 cada 100-150 procedimientos realizados según la SEGO (SEGO, 2012) o de 0,11% para la amniocentesis y el doble para la biopsia según la última publicación (Akolekar, 2015). Aunque el riesgo de pérdida es bajo, el impacto emocional en la pareja ante una pérdida es alto por lo que se están desarrollando nuevas técnicas que permiten detectar mutaciones en el ADN fetal circulante en la sangre materna. El primer caso para ACH se realizó en el 2000 (Saito, 2000) en una gestante de 24 años a la que en la semana 30 se detecta un feto con probable ACH. Se realizó el estudio en ADN fetal y se comprobó mediante amniocen-

tesis. En nuestra serie se pudo realizar en 3 gestaciones ya avanzadas: los casos ACH-230 y HCSC-1 ante un feto con sospecha de ACH, en el que se confirmó la presencia de la mutación, y en el caso ACH-223 como diagnóstico diferencial que resultó negativo.

La concentración de ADN fetal en sangre materna aumenta a lo largo de la gestación de modo que su detección en embarazos avanzados es más fácil. En estos tres casos de nuestro estudio, todos los resultados fueron concordantes, aunque al ser una serie muy pequeña no podemos estimar la sensibilidad de esta técnica.

#### **5.2.1.1.2. Resultados prenatales negativos**

Veintiocho casos resultaron negativos tanto para el cariotipo como para el estudio del gen *FGFR3*. En los 20 casos en los que se puede realizar el seguimiento del embarazo, algo más de 1/3 presentaron un fenotipo que resultó dentro del rango de la normalidad.

Tres casos presentaban una clínica más indicativa de cromosomopatía por ser fetos polimalformados: ACH-194, ACH-327 y ACH-265. En estos casos la indicación primera debería ser el cariotipo, ya que los fetos polimalformados suelen ser debidos a síndromes cromosómicos y presentan frecuentemente micromelia. Ante un resultado normal, eran candidatas para estudios de CGH-array que aportan información sobre otras alteraciones crípticas cromosómicas. La solicitud inicial en todos ellos fue de estudio de displasias óseas.

A pesar de que el diagnóstico ecográfico de fetos con ACH suele realizarse en el tercer trimestre (Cordone, 1993), el diagnóstico sugerido por el facultativo en 10 de los 19 casos del 2º trimestre era de ACH, a los cuales hay que sumar 4 casos con la indicación de micromelia. Todos tuvieron un resultado negativo.

Existen numerosos artículos de diagnósticos prenatales de ACH. En ellos se intenta destacar una serie de signos clínicos que nos permitan diagnosticar un feto afecto de ACH (Chitty, 2011):

- La micromelia se observa la mayoría de las veces al inicio del tercer trimestre (a partir de la semana 25 de gestación). En nuestra serie, de los 16 casos en los que se solicita estudio de ACH como única patología o junto a HCH, osteogénesis imperfecta o aneuploidías, 10 se solicitaban antes del tercer trimestre (25 semanas de gestación) y todas fueron negativas para el gen *FGFR3*.
- Se observa una macrocefalia relativa y una circunferencia abdominal ligeramente aumentada, como medidas objetivamente valorables.

- El tórax estrecho característico de la ACH es difícil de ver, pero sí se debe saber diferenciar de un tórax muy estrecho característico de la displasia tanatofórica.
- La curvatura del fémur tiene relativa frecuencia (1/3) y se puede observar bien a lo largo del 3er trimestre.
- Sin embargo un 42% de los fetos afectados de acondroplasia presenta un ratio FL/AC <0.16 en el tercer trimestre. Es decir, el valor propuesto para diagnóstico de una forma letal no funciona en casi la mitad de los casos cuando nos encontramos en una gestación avanzada (Rahemtullah, 1997; Parrilla 2003). No obstante sí tiene valor pronóstico en el segundo trimestre aunque no en el tercero (Rahemtullah, 1997; Chitty, 2011).

De hecho, en el estudio comparativo de 100 fetos afectados de ACH recogidos en distintas series desde 1996 a 2014, el parámetro ecográfico más frecuentemente observado, tras fémur corto que estaba en el 100% de los casos, fue la frente abombada (47,2%) seguido de polihidramnios (45,6%) (Khalil, 2014).

Existe un nuevo parámetro que se puede detectar ecográficamente y que permite diferenciar a un feto afecto de ACH, de otro con SGA o sin alteración. Es el llamado ángulo femoral que resulta del ángulo entre la diáfisis y metáfisis del femoral proximal. En los fetos con ACH parece ser que este ángulo es más amplio que en los otros dos grupos (Boulet, 2009; Khalil, 2014).

De nuevo en nuestra serie desconocemos los valores ecográficos de longitud de fémur y abdomen por lo que no podemos aplicar estos marcadores para evaluarlos. Sería de gran utilidad proporcionar unos datos ecográficos más exactos de los distintos parámetros fetales en el 2º y 3º TM para plantear posibles diagnósticos diferenciales.

A pesar de todos estos marcadores propuestos y valorados, el diagnóstico ecográfico de la ACH es dificultoso por lo que se recomienda siempre el diagnóstico molecular de la mutación p.Gly380Arg en el gen *FGFR3* dada la gran sensibilidad que tiene (98%, Bellus, 1995; Superti-Furga, 1995). Que el diagnóstico ecográfico de ACH es difícil queda plasmado en el artículo de Modaff en el que se revisa qué se detectó ecográficamente a 28 pacientes afectados de ACH esporádicos: al 57% se le reconoció algún tipo de anormalidad ecográfica a lo largo del embarazo sin especificar en ningún momento qué tipo, al 25% se le dio un diagnóstico incorrecto de una forma letal de displasia esquelética y al 23% se le dio un resultado cercano: probable ACH o enanismo no letal (Modaff, 1996).

El diagnóstico prenatal de casos esporádicos de HCH es aún más dificultoso por la ausencia de signos clínicos incluso al nacimiento y su amplio espectro fenotípico. Aquellos casos descritos en la bibliografía son los casos más severos: al



primero de ellos se le detectó una displasia esquelética no filiada que con la evolución se catalogó de HCH. En este caso no se conocía aún que las mutaciones en el gen *FGFR3* eran las responsables de esta patología (Jones, 1990). Está publicado el caso de un feto afecto de HCH resultado de una madre afectada de ACH y un padre afecto de HCH. Ante la patología de los progenitores, se consideró un embarazo de riesgo y se realizaron ecografías seriadas del feto. Hasta la semana 25 no se apreció el acortamiento de los huesos largos y a lo largo del embarazo permitió caracterizar el feto como afecto de HCH porque la longitud no era normal pero tampoco tan severa como en los fetos afectados de ACH. La circunferencia craneal fue normal en todo momento (Huggins, 1999). El siguiente caso descrito fue en el 2004 donde se detectó una displasia esquelética no letal con micromelia a la semana 26 de gestación. Al nacimiento, y por las radiografía realizadas al neonato, se diagnosticó de afecto de HCH y se detectó la mutación p.Gly540Lys (Kataoka, 2004). Más tarde, Karadimas describió dos fetos estudiados por presentar fémur corto y parámetros ecográficos (FL/AC) no letales. Se realizó cariotipo y estudio de ACH prenatalmente. El estudio de HCH (p.Gln540Lys) se realizó postmortem (Karadimas, 2006). En nuestra serie no hay ningún caso de HCH a pesar de descartarse en todos los casos las mutaciones más frecuentes encontradas en esta patología. Sí es solicitada en 3 casos: ACH-92, ACH-98 y ACH-100. En los 3 como diagnóstico diferencial con la ACH.

En 6 casos la clínica era debida a una patología ósea distinta a las características de mutaciones en *FGFR3* (displasia campomélica y displasia torácica asfixiante) o una patología no ósea (cardiopatía grave, Artrogriposis múltiple, Poliquistosis renal, tratamiento con corticoides):

- Displasia campomélica (ACH-137): es una rara y fatal osteocondrodisplasia autosómica dominante causada por mutaciones en el gen *SOX9* (OMIM 608160) que es un factor de transcripción esencial para el desarrollo sexual y del esqueleto. Se caracteriza por fetos con huesos largos incurvados y alteraciones genitales con la característica reversión sexual en varones (cariotipo XY con genitales femeninos). Suelen presentar dificultad respiratoria severa que provoca el fallecimiento al nacimiento. También pueden presentar alteraciones de otros sistemas como son cardíaco, pulmonar y neurológico. La displasia campomélica fue confirmada en nuestro laboratorio presentando la mutación en heterocigosis c.1242\_1243insT en el gen *SOX9* que provoca el cambio de una prolina a serina en el codón 415 y genera un codón de parada temprana 163 aminoácidos más adelante [p.Pro415Serfs\*163] (Carvajal, publicación en proceso).
- Displasia torácica asfixiante vs feto polimalformado (ACH-327).
- Cardiopatía grave (ACH-65): los fetos que presentan cardiopatía tienen un riesgo aumentado de desarrollar CIR y el riesgo aumenta cuanto más

grave es la cardiopatía (Wallenstein, 2012). Además presentan valores disminuidos de la longitud del fémur, de la longitud total, del peso y la circunferencia torácica (Itsukaichi, 2011).

- Artrogriposis múltiple (ACH-211): es un grupo heterogéneo de desórdenes osteomusculares caracterizado por contracturas congénitas que afectan a varias articulaciones, sobre todo de los miembros aunque puede asociar anomalías en otros órganos (corazón, pulmón y riñón).
- Poliquistosis renal (ACH-87): caracterizada principalmente por la presencia de múltiples quistes bilaterales que alteran la función renal, terminando en una insuficiencia renal crónica e incluso la pérdida total de los mismos. Puede afectar también a otros órganos, principalmente el hígado y el páncreas. Existen dos tipos principales según el modo de herencia: la dominante, de inicio en la edad adulta y con una prevalencia mayor que la recesiva, de inicio en la infancia e incluso congénita con una clínica mucho más severa y peor pronóstico. No se ha encontrado en la bibliografía que esta enfermedad conlleve micromelia, fémur corto ni otra alteración ósea significativa.
- Tratamiento con corticoides (ACH-92): era una gestante en tratamiento con corticoides por padecer un lupus eritematoso sistémico en tratamiento. El uso de corticoides de forma antenatal se utiliza en aquellos fetos que se suponen serán pretérmino para acelerar su maduración consiguiendo disminuir tanto la morbilidad como la mortalidad de los neonatos. Sin embargo también se ha demostrado que su uso continuado aumenta el riesgo de fetos SGA así como fetos con bajo peso, con talla baja, con perímetro craneal menor y placenta de menor peso (Wapner, 2006; Elfayomy, 2014). Por lo tanto en esta familia parece ser que la displasia ósea que presentaba era secundaria al tratamiento con los corticoides.

En conjunto y teniendo en cuenta estos resultados, nuestra propuesta de protocolo ante una gestación en curso con un feto con sospecha de displasia ósea por mutaciones en *FGFR3* con progenitores aparentemente no afectados, sería la siguiente:

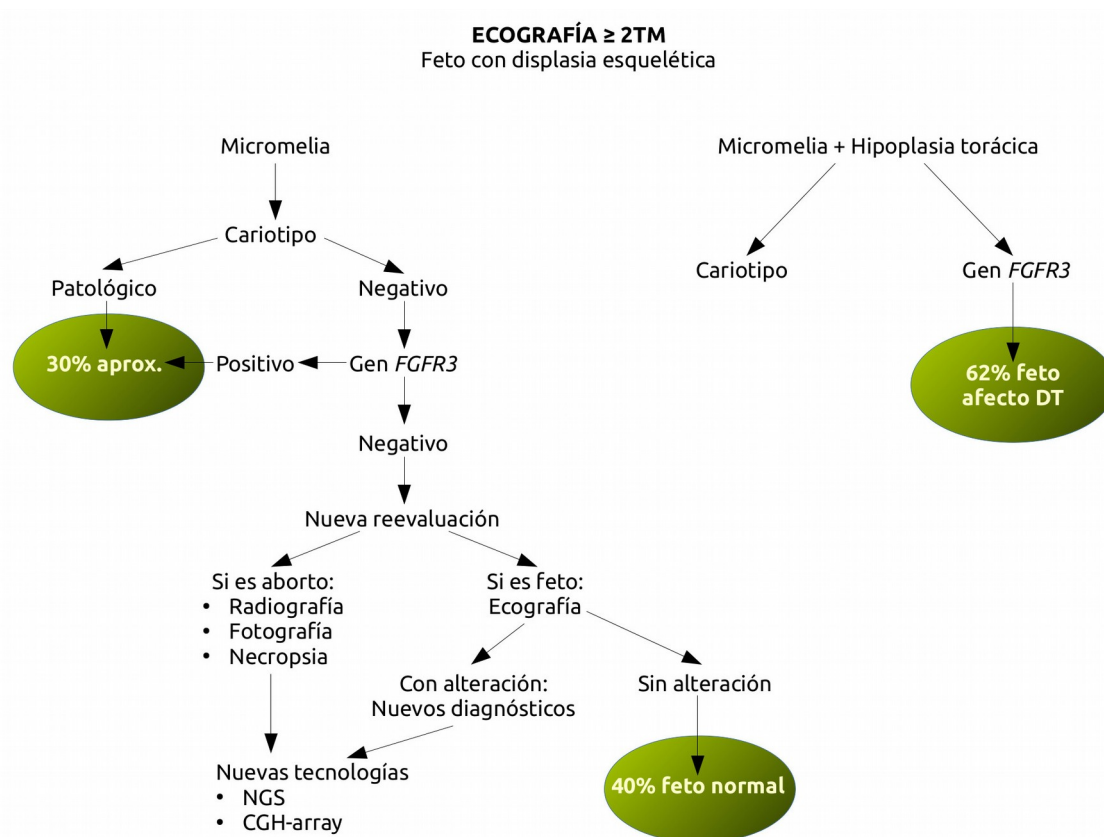
1. Ecografía prenatal: sería necesario un buen informe ecográfico que describiese las alteraciones óseas observadas y que indicase, claramente, entre los parámetros medidos, la longitud del fémur con percentiles y desviaciones estándar, la medida de la circunferencia torácica, abdominal y el ángulo femoral. En esta ecografía tendría que venir indicado si la displasia ósea tiene características letales, dada la alta sensibilidad que tiene este signo. El seguimiento ecográfico es también una herramienta muy potente para el diagnóstico diferencial.

2. Ante una interrupción legal del embarazo o pérdida del mismo es recomendable, tanto la necropsia como la realización de radiografías y fotos para posibles diagnóstico diferenciales.
3. Es necesaria una muestra fetal que se puede obtener por métodos invasivos intraútero en una gestación en curso o de los restos abortivos.
4. Ante un feto con una ecografía a partir del 2ºTM que indique micromelia/fémur corto, se realizará un cariotipo y la secuenciación del gen *FGFR3* ya que casi el 30% será positivo para uno u otro. Si el resultado de estos dos estudios es negativo, y no se encuentran más alteraciones en las sucesivas ecografías, el 40% de los casos presentará un fenotipo dentro del rango de la normalidad.
5. Ante un feto con una ecografía a partir del 2ºTM que indique micromelia junto a hipoplasia torácica, el 60% de los casos será positiva para alguna de las mutaciones en el gen *FGFR3* con expresión de displasia tanatofórica.
6. Ante unos resultados negativos de estos estudios, la necropsia y la toma de radiografías y fotos del feto orientarán el estudio a otros estudios diagnósticos. Para estos nuevos diagnósticos puede ser de utilidad la técnica de secuenciación masiva (NGS) que permite el estudio simultáneo de muchos genes en amplios paneles clínicos que puede aportar nuevos diagnósticos a la par que abaratar los estudios.

Protocolos similares han sido propuesto por otros autores (Hurst, 2005; Trujillo-Tiebas, 2009; Pazzaglia, 2014).

En la **figura 5.1** se muestra el algoritmo de trabajo propuesto para la situación de un feto que presente micromelia con o sin hipoplasia torácica, detectado en una ecografía a partir del 2ºTM. La presencia de micromelia en el 1º TM requiere de seguimiento ecográfico hasta la semana 16 de gestación donde se ha de realizar una ecografía exhaustiva y realizar las medidas antropométricas fetales lo más completa posible.

**Figura 5.1. Algoritmo de trabajo propuesto ante un feto con alteraciones ecográficas a partir del 2ºTM: con micromelia (izquierda) o con micromelia e hipoplasia torácica**



### 5.2.1.2. Estudio por un antecedente familiar en mayor o menor grado de parentesco y con estudio molecular positivo

De los 13 casos en los que existe un antecedente familiar con estudio molecular confirmatorio, las que realmente tienen indicación de estudio son las 5 madres afectas de ACH, que al tener un patrón de herencia autosómico dominante, la posibilidad de transmitirlo a su descendencia es de un 50% en cada embarazo e independientemente del sexo. Todas ellas se hicieron una técnica invasiva prenatal en el primer trimestre, mediante biopsia corial.

La bibliografía indica que la gran mayoría de los pacientes afectados de ACH no les importa tener descendencia afectada. Así lo demostró Gooding en su trabajo del 2002 donde sólo el 29% de los progenitores afectados se harían una prueba para conocer el *estatus* de su feto, frente a un 87% que lo utilizaría para conocer la presencia de un feto con mutación en homocigosis p.Gly380Arg, ante unos progenitores ambos afectados y que presenta una condición fatal para el recién nacido (Gooding, 2002). La calidad de vida así como las dificultades encontradas, superadas o no, para desarrollar una vida plena, es decir, cómo vive cada

uno su enfermedad y cómo convive con ella, son realmente los parámetros que miden la aceptación o no de una descendencia afecta (Gollust, 2005).

En nuestra serie sólo tuvimos acceso a dos pacientes afectas de acondroplasia que acudieron al Servicio de Obstetricia para realizarse una biopsia de corion (ACH-91 y ACH-114). Las dos se realizaban la prueba para descartar una anomalía cromosómica, no para descartar un feto portador de la mutación p.Gly380Arg. En ambos casos, el resultado fue negativo y ambas perdieron el feto. En ambas la obtención de la muestra fue dificultosa, probablemente debido a las características óseas de estas pacientes. Hubiese sido conveniente la realización de una amniocentesis, técnica invasiva más tardía pero menos dificultosa en su realización, ya que consiste en una punción transabdominal de fácil acceso. Una de ellas (ACH-114), volvió a quedar embarazada un año después y no se realizó ninguna prueba invasiva, resultando un varón afecto de acondroplasia.

Cuando los progenitores no son afectos pero han tenido un descendiente afecto de ACH y confirmado molecularmente, la realización de un estudio de ACH en una gestación en curso, sólo se justifica por la presencia de mosaicismo germinal. El primer caso descrito data del año 1974 (Bowen, 1974), sin embargo, desde entonces no más de media docena de casos se han publicado; con una frecuencia estimada de 0,02% (Mettler, 2000); tan baja que algún autor postula que, más que un mosaicismo germinal, sean dos eventos moleculares distintos (Henderson, 2000). Este argumento se rebatió con la publicación del caso de un varón no afecto con ausencia de la mutación en sangre periférica y que tuvo 32 fetos afectos. Se detectó la mutación en sus espermatozoides (Natucci, 2008), es decir, era un mosaicismo germinal puro. También se ha descrito la mutación somática en uno de los progenitores supuestamente no afectos (Rimoin, 1969; Henderson, 2000).

Cuando una progenitor no es afecto pero tiene un familiar afecto no directo, no existe la recomendación de diagnóstico prenatal. Es el caso ACH-75: gestante que presentaba un sobrino vía materna afecto de síndrome de Muenke (p.-Pro250Arg). Los progenitores de ese niño no eran afectos con lo cual no había indicación para estudio prenatal. El bajo porcentaje de mosaicismo germinal sólo podría aparecer en los progenitores del niño afecto, nunca en la tía, dado que la penetrancia de la mutación es completa y además congénita.

#### **5.2.1.3. Estudio por un antecedente familiar sin diagnóstico molecular confirmatorio**

Se recogieron 13 casos en los que había un antecedente de una posible displasia ósea sin confirmación molecular. Todos los resultados fueron negativos.

En este caso, no está justificado la realización de una prueba invasiva porque la premisa inicial para realizar este tipo de diagnóstico es conocer la mutación

en el familiar afecto. Como se ha comentado anteriormente, el diagnóstico ecográfico de una displasia ósea es relativamente fácil. La dificultad radica en filiar adecuadamente esa displasia ósea. Por lo que un antecedente personal de displasia esquelética sin filiar no es razón suficiente para un diagnóstico en una gestación siguiente porque no se sabe qué se descarta al no conocerse la mutación en el feto anterior. Del mismo modo, dada la casi nula posibilidad de recurrencia cuando los progenitores no son afectados, tampoco se puede realizar para descartar un posible mosaicismo germinal de una mutación que, además, se desconoce.

Como se puede observar en esta serie, el número de solicitudes disminuye drásticamente del periodo primero (10 casos) al segundo (3 casos), así como el tipo de técnica prenatal solicitado que pasa de biopsia de corion a la última solicitud en el 2008 mediante amniocentesis, prueba de mayor accesibilidad y con menor riesgo de pérdida fetal. Suponemos que es debido a la introducción de la genética clínica y el asesoramiento genético de forma generalizada en el ámbito sanitario que ha permitido dar respuesta a esta situación.

#### 5.2.1.4. Asesoramiento genético

El diagnóstico ecográfico de una displasia ósea presenta bastantes dificultades y requiere del apoyo de otras especialidades médicas, entre las que está la genética, para poder filiar estas displasias. Por otro lado, la presencia de una alteración ecográfica supone un estrés para los progenitores. Es necesaria la formación de un equipo interdisciplinar formado, al menos, por ginecólogos y genetistas expertos en diagnóstico prenatal, que consigan informar de la situación explicando qué diagnósticos diferenciales se pueden realizar y en qué tiempos se puede dar una respuesta. Todas las pruebas invasivas fetales para la obtención de muestra fetal, tienen un riesgo de pérdida fetal por lo que su indicación tiene que estar bien justificada.

La consulta de Genética Clínica tras un embarazo patológico, donde se explica qué se ha buscado y qué se ha encontrado y qué se puede esperar en los siguientes embarazos, contribuye a la minimización de la ansiedad en la pareja y predispone a un nuevo embarazo en condiciones menos ansiosas.

Con el protocolo propuesto ante un feto con alteraciones ecográficas susceptible de displasia esquelética, se pretende obtener un diagnóstico certero que permita realizar un adecuado consejo familiar y reproductivo a los progenitores. Este consejo debe incluir:

- Si se ha conseguido confirmar la sospecha clínica con una mutación en el gen *FGFR3*: el consejo genético reproductivo debe incluir la baja probabilidad de recurrencia en futuras gestaciones. Se debe realizar una medida antropométrica de los progenitores lo más completa posible para descartar cualquier displasia ósea en mosaico. Ante la sospecha o datos no con-

cluyentes de estas medidas, se puede realizar el estudio molecular de la mutación encontrada en sangre periférica, teniendo en cuenta que la ausencia de mosaicismo somático no descarta la presencia de un mosaicismo germinal. Si los estudios en los progenitores son todos negativos, indicar que el riesgo de recurrencia es  $<0,1\%$ . Ante ansiedad de los padres se puede realizar:

- Un diagnóstico no invasivo mediante el estudio de ADN fetal en sangre materna a partir de la semana 8. En este caso incluimos tanto las gestaciones en las que ha habido un feto afecto como en las que se tiene un hijo ya nacido y diagnosticado molecularmente tras el nacimiento.
- Un diagnóstico prenatal en futuras gestaciones, recomendando la amniocentesis como mejor método.

Cualquier otro caso de displasia ósea por mutaciones en el gen *FGFR3* de unos progenitores no afectados, en donde el caso positivo no sea un antecedente directo, no se recomienda hacer ningún tipo de estudio.

- Si no se consigue confirmar molecularmente la sospecha clínica para una mutación en el gen *FGFR3*: el consejo genético reproductivo debe indicar que, al no confirmarse, no se puede realizar ningún tipo de diagnóstico fetal en los siguientes embarazos con lo cual no está justificado el estudio. Queda a expensas del diagnóstico ecográfico, el cual se recomienda un seguimiento más exhaustivo dado el antecedente.

Si se trata de un progenitor afecto de ACH y/o HCH, es necesario la realización de un adecuado Consejo Genético en el que en la parte reproductiva se indique el riesgo de recurrencia, la posibilidad de formas más severas y letales en el caso de que ambos progenitores sean afectados y las técnicas existentes en el diagnóstico reproductivo, que son:

- Diagnóstico prenatal no invasivo: mediante el estudio de ADN fetal en sangre materna. En el caso de ACH, el primer artículo publicado es de 2007 en donde una gestante con riesgo de feto afecto por padre con ACH molecularmente comprobado, es estudiada (Li, 2007). Esta técnica permite recoger la muestra de sangre periférica entre la semana 8 y la 14. Si el resultado indica la presencia de la mutación paterna, se recomendaría una técnica invasiva para la obtención de una muestra fetal para corroborar la presencia de la mutación en el feto. Hoy en día se está desarrollando una nueva tecnología, basada en la PCRdigital, que permite distinguir ADN fetal en sangre materna cuando es la madre quien padece la enfermedad (Lun, 2008; Bustamante-Aragonés, 2010; Barrett, 2014).



- Diagnóstico prenatal invasivo: de una gestación en curso. Si los progenitores no desean una descendencia afecta, indicar las ventajas e inconvenientes de una técnica temprana (biopsia de corion) o una más tardía (amniocentesis). Hay que tener en cuenta que si es la madre la afecta, es aconsejable la amniocentesis.
- Técnicas de reproducción asistida:
  - Donación de gametos sexuales o embriones
  - Diagnóstico preimplantacional: explicando el tipo de proceso que es, la duración, y el porcentaje de éxito de esta técnica. La primera aplicación técnica de esta metodología es de 1990 (Strom, 1990; Verlinsky, 1990) y la primera neonata nacida en 1992 (Handsyde, 1992). En el caso de la ACH el primer caso publicado nacido de una técnica de este tipo fue en el 2008 en una pareja en la que la madre era afecta de ACH (Altarescu, 2008). Sin embargo, hay que tener en cuenta que, sin conocer el motivo, la estimulación ovárica en pacientes afectas de ACH tiene bajo rendimiento. Además la punción ovárica es problemática ya que los ovarios se encuentran en la región pélvica superior. Si a estos dos inconvenientes se les suma que la anestesia general, necesaria para la extracción de ovocitos, está poco recomendada en pacientes afectados de ACH ya que su displasia ósea dificulta su entubación, hay que considerar con cierta prudencia el diagnóstico preimplantatorio en parejas solicitantes en las que la mujer es afecta (Moutou, 2003).

En nuestra serie el paciente de la familia ACH-204 era un varón de 37 años con diagnóstico clínico de ACH confirmado en nuestro laboratorio al presentar la mutación p.Gly380Arg. Este paciente y su compañera, de 34 años y no afecta, solicitaron un diagnóstico preimplantatorio por medio de la cartera de Servicios de la Comunidad. Se realizaron 2 ciclos completos sin obtener embarazo alguno.

En el Sistema Nacional de Salud se contemplan estas opciones reproductivas en la cartera de servicios comunes mediante el Real decreto 1030/2006, de 15 septiembre, y la Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre.

El tiempo es un elemento que juega en contra de estos diagnósticos ya que existen unos plazos legales de interrupción voluntaria del embarazo (Ley Orgánica 2/2010) así como unas intervenciones sobre el mismo en función de las semanas de gestación y un estrés emocional asociado. La Ley Orgánica 2/2010 permite la interrupción voluntaria hasta la semana 22 de gestación pero es ampliable presentando el caso ante un Comité Clínico que evalúa de forma personal cada uno de las situaciones. Es por ello fundamental el equipo interdiscipli-

nar que permita reducir la ansiedad a la vez que dar respuesta adecuada en el seguimiento de estos embarazos.

### **5.2.2. Gen *RMRP***

#### **5.2.2.1. Asesoramiento genético**

Una buena caracterización molecular mediante el estudio del gen *RMRP*, permitió, por un lado, confirmar el diagnóstico, y por otro la realización de un asesoramiento genético familiar y reproductivo en la familia ACH-128, con el desarrollo de una nueva metodología específica para esta familia: el diagnóstico prenatal no invasivo para la detección de la mutación paterna en sangre materna ante una nueva gestación.

El primero de ellos, en el año 2010, se realizó un diagnóstico prenatal no invasivo a partir del ADN fetal obtenido en sangre materna a la semana 9 de gestación en la que se observó la presencia de la mutación paterna (g.236A>G), por lo que se recomendó el diagnóstico prenatal invasivo realizándose una amniocentesis, bajo consentimiento de la gestante, en la semana 16 con el resultado de feto hembra portadora de las dos mutaciones en heterocigosis. La gestante decidió interrumpir el embarazo. Dos años más tarde, en 2012, la madre vuelve a quedar embarazada y se volvió a realizar el diagnóstico prenatal no invasivo en la semana 9 no identificándose la mutación paterna en la muestra extraída. La técnica invasiva realizada en la semana 11 de gestación (biopsia de vellosidad corial) confirmó la ausencia de la mutación paterna así como la de la materna en un feto varón no portador de ninguna mutación. En la actualidad, este varón de 3 años, presenta un desarrollo normal acorde a su edad. El estudio de las muestras del diagnóstico prenatal no invasivo fue realizado por la Dra. Sara Perlado Marino como parte de su trabajo de investigación.

### **5.2.3. Gen *SHOX***

#### **5.2.3.1. Asesoramiento genético**

Esta pareja recibió una consulta de asesoramiento genético tras la caracterización completa, mediante técnicas citogenéticas y moleculares, de la translocación ocurrida en el feto.

En este caso el cariotipo es un hallazgo casual ya que el foco hiperecogénico cardíaco encontrado no se tradujo en ninguna clínica al nacimiento y además las alteraciones cardíacas no son características de alteraciones en el gen *SHOX*. La medida de todos los huesos en la semana 26 se realizó más exhaustivamente por el diagnóstico de la displasia ósea y en ella se observó unos valores normales para todos los huesos exceptuando para el húmero que se encontró límite. Si bien es verdad que se observó una posición anormal de las muñecas (*figura*

**4.11; pág 99**), de nuevo ésta es observada por el seguimiento especial que se hacía con vistas a encontrar algún signo clínico de la displasia.

Al nacimiento, el neonato presentó valores absolutamente normalizados con una exploración rigurosamente normal. La exploración última realizada a los 6 meses de edad sólo cabe destacar un dato límite que fue una braza 3 cm menor que la talla total. Es decir, si la pareja ante ese signo menor que constituye el foco hiperecogénico no se hubiese realizado la amniocentesis, con vistas a descartar una aneuploidía (trisomía 21, la más frecuente a esas semanas de gestación sin otra alteración ecográfica más allá del foco hiperecogénico cardíaco), no había ningún signo clínico que indicase estudios adicionales en el feto ni en el neonato. De ahí concluimos que es un hallazgo casual el encontrado en el cariotipo.

La discondrosteosis de Léri-Weill tiene una variabilidad fenotípica muy grande por lo que el pronóstico a la pareja no es resolutorio. Dada la talla del padre (182 cm) y de la madre (169 cm), la talla genética esperada para el paciente es de 182 cm (P75-90, +1,05 SDS). Es poco probable que alcance dicha talla pero tampoco tiene por qué tener una talla baja patológica, lo que sí es esperable presentar una talla baja para lo esperado. La delección encontrada puede manifestar dos fenotipos:

- talla baja sarmónica, lo que quedaría como una talla baja por haploinsuficiencia del *SHOX*;
- talla baja disarmónica con presencia o no de deformidad de Madelung por lo que sería afecto de discondrosteosis de Léri-Weill. La malformación de Madelung aparece en 2/3 de los pacientes pero es más acusada y agresiva en mujeres (Ross, 2001). La ventaja de conocer la delección en este gen es que permite adelantarnos a los signos clínicos que pueda tener así como evitar pruebas adicionales para el diagnóstico de una posible malformación de cúbito y radio o de talla baja con o sin desproporción.

Existe un caso similar descrito en la bibliografía. Como en este caso, se detectó una translocación con implicación del cromosoma Y de forma prenatal por presentar en la semana 22 de gestación un leve CIR. El estudio del cariotipo fetal puso de manifiesto la presencia de una línea celular 45,XY,dic(Y;22)(p11.3;p11). Mediante FISH se demostró la ausencia del gen *SHOX* y la presencia del gen *SRY*. Se decidió continuar con el embarazo. Al nacimiento el neonato presentó una talla de 48cm (-1SDS) con un peso de 2930g (-0,9SDS) con una exploración normal. A la edad de 4 años, el paciente vuelve a la consulta de genética por presentar una talla baja con -3SDS armónica y sin alteraciones radiológicas (Borie, 2004).

La translocación encontrada en este caso tiene repercusiones reproductivas para el paciente. Las translocaciones Y;autosomas parecen tener un papel relevante en la infertilidad del hombre, sin embargo cuando está implicado un cromosoma acrocentrico (como el 21) no parece tener tanta relevancia (Delobel, 1998). Sería de esperar un mayor riesgo de descendencia masculina con trisomía 21 (al presentar espermatozoides con un cromosoma 21 libre y otro con el derivado de la translocación Y;21) y de descendencia con trisomía XXY (al presentar espermatozoides con un cromosoma X y otro derivado de la translocación Y;21), sin embargo en el estudio realizado en un varón que presentaba un mosaicismo en sangre de una translocación Y;21, con implicación de la región subtelomérica del Yq, el estudio mediante FISH en espermatozoides, indicaba un porcentaje cercano al 10% de células con ausencia de cromosoma sexual, probablemente porque ante la pérdida de la región subtelomérica del cromosoma Y se produce una incorrecta segregación meiótica que termina perdiéndose (Röpke, 2013). La fecundación de un óvulo por este espermatozoide sin cromosoma sexual daría lugar a un embrión 45,X (síndrome de Turner) que es la causa principal de abortos en el primer trimestre (Hassold, 1980). Existe otro estudio en hombres infértiles por azoospermia no obstructiva, en el que un 10% de los varones con cariotipo normal y microdeleciones AZF presentaban alteraciones tanto por deleción como por duplicación de las regiones PAR1, que implicaban al gen *SHOX*, así como de la región PAR2 (Jorgez, 2011).

Por tanto, se puede advertir de una posible infertilidad/esterilidad (oligoespermia/azoospermia) y de descendencia afecta en un porcentaje variable. Su descendencia masculina además presentará la deleción del gen *SHOX* por lo que, cuando el niño llegue a edad reproductiva y desee tener descendencia, es recomendable que acuda a una nueva consulta de Genética Clínica para recibir información actualizada.

## **5.3. ESTUDIOS POSTNATALES**

### **5.3.1. Gen *FGFR3*: acondroplasia, hipocondroplasia, displasia tanatófica y síndrome de Muenke**

#### **5.3.1.1. Resultados positivos**

Las patologías encontradas en los 88 casos remitidos para estudio fueron:

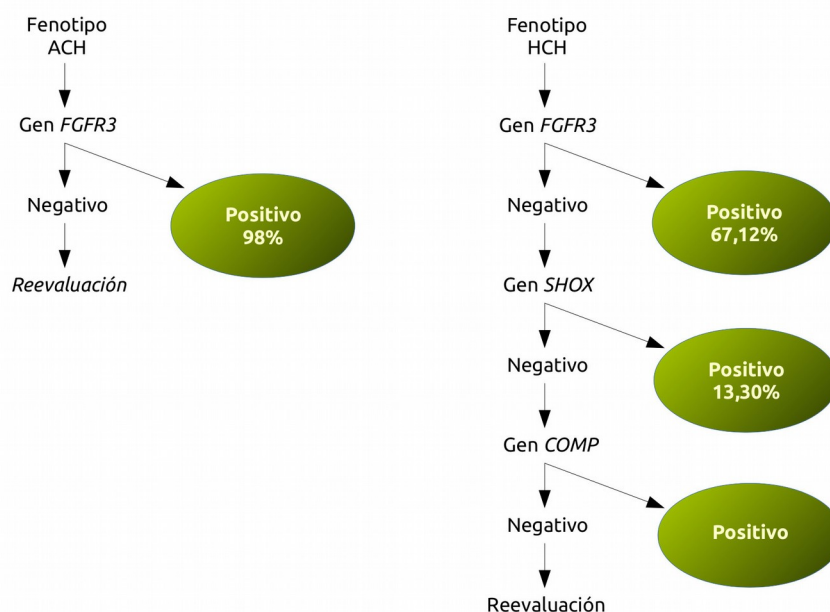
- 31 casos de ACH con un fenotipo reconocible, según la indicación clínica, en 29 de los 31 casos.
- 9 casos de HCH con un fenotipo reconocible en 8 de los 9 casos.

- 2 casos de síndrome de Muenke, ninguno con una clínica que sugiriese este síndrome, según indicación
- 1 caso de DT-I en un neonato con clara indicación clínica

Además de estos 43 casos positivos, se obtuvieron 4 casos positivos para alteraciones en el gen *SHOX* (13,3%) y 1 paciente con mutación en hemicigosidad c.1645C>T; p.Arg549\* lo que le diagnosticó de afecto de raquitismo hipofosfático ligado al X.

No podemos definir un patrón clínico en los pacientes afectados ni de ACH ni de HCH porque la clínica no se especificaba en ningún caso. Pero sí podemos definir un algoritmo de trabajo que se muestra en la **figura 5.2**.

**Figura 5.2. Algoritmo de trabajo propuesto ante un paciente con fenotipo acondroplásico (izquierda) y otro con fenotipo hipocondropásico (derecha)**



### 5.3.1.1.1. Polimorfismos

Dentro de los polimorfismos encontrados, el rs17881656 del exón 9 se encuentra francamente aumentado en nuestra serie.

La variante c.1150T>C, p.Phe384Leu [rs17881656] fue descrita en 2004 por Trujillo-Tiebas y col en dos familias: la ACH-50 en un neonato con una displasia ósea grave con la mutación heredada de su padre y de su abuela paterna. Ninguno de los dos familiares presentaba la displasia grave de la *probandus* pero sí presentaban una talla baja (padre 161cm, -2,57SDS) e incluso patológica (abuela paterna: 131cm, -5,62SDS) con disarmonía relativa. En la segunda familia, ACH-52, el *probandus* era un varón de 18 años sin descripción clínica y solicitud por

parte del facultativo de estudio de HCH. El resultado final fue de varón afecto de HCH por mutación en heterocigosis c.1620C>A, p.Asn540Lys, que además presentaba esta variante heredada de la madre, que no presentaba la mutación c.1620C>A. En el estudio que se realizó en la publicación, la frecuencia de esta mutación en la población general (97 individuos) fue de 0,0005%, 1 variante en 194 alelos. La frecuencia del alelo menor publicada en la base de datos SNPs es de 0,0008 y en ella se indica que la relevancia clínica no se conoce (Trujillo-Tiebas, 2004).

Además de las familias arriba descritas, también hemos encontrado este polimorfismo en tres familias más: ACH-85 que era un aborto que prenatalmente presentaba oligoamnios y extremidades inferiores cortas con estudio negativo para las mutaciones patogénicas de *FGFR3*, pero que presentaba este polimorfismo heredado de la madre. En la familia ACH-285, donde la *probandus* era una niña de 10 años de etnia indígena (Ecuador) que presentaba talla normal pero con desproporción y venía para estudio de *SHOX* al presentar una puntuación en la escala de Rappold de 4. El estudio completo del gen *SHOX* resultó negativo y se amplió el estudio a *FGFR3*, también negativo pero con este polimorfismo. Los progenitores presentaban ambos talla baja patológica con antecedentes por ambas partes de familiares con talla baja patológica. Además la madre era disarmónica. El estudio de este polimorfismo en los progenitores indicó que era el padre el portador del mismo. Por último, también apareció en la familia HCSC-20, en un feto afecto de acondroplasia que además presentaba esta variante heredada de la madre, que no presentaba clínica ni de talla baja ni de disarmónica.

Nuestra frecuencia es muy superior a la encontrada en la bibliografía y además siempre heredada de un progenitor con o sin clínica sugerente, por lo que no se puede establecer una segregación con clínica. Destacamos la alta frecuencia en población afecta.

El significado de esta variante no es conocido. En las distintas bases de datos consultadas se dan distintas informaciones:

- desde Ensembl, se describe como una mutación somática con número COSM724, descrita en tejido tumoral con unos valores de SIFT y POLYPHEN de tolerable y benigno, respectivamente.
- desde la base de datos HGMD está publicada con clínica de displasia esquelética pero de significado incierto. En esta misma base ponen como referencia adicional el estudio de Bodian y col. (2014). En su estudio de genes con susceptibilidad al cáncer, encuentra que esta variante Phe384-Leu, c.1150T>C, en el gen *FGFR3* se encuentra con una frecuencia alélica de 0,0037 y sólo en Europa y la población hispánica y la considera una variante con susceptibilidad al cáncer (Borien, 2014). De hecho desde que

se encontró que el gen *FGFR3* juega un papel importante en la tumorigénesis de los carcinomas uroteliales de vejiga (van Rhijn, 2004; Huang, 2015), la mayoría de las publicaciones de estos polimorfismos viene en publicaciones oncológicas. Las mutaciones somáticas del gen *FGFR3* aparecen en el cáncer de vejiga, en los mielomas múltiples y en los linfomas de células T en donde la sobreexpresión de la proteína permite la transformación de las células a cancerígenas y constituye una potencial diana farmacoterapéutica (Lin, 2014; Faltas, 2015).

- Los programas predictores de MutationTaster, VEP, HPMV, MutationAssessor, KingMut2 y Mutalyzer, le dan un valor benigno.
- El programa predictor FATHMM le da un valor deletéreo

Por todo ello, parece lógico concluir que esta variante es benigna y no produce por sí un fenotipo de displasia ósea aunque no podemos descartar que module agravando la clínica cuando ya hay otra mutación conocida. Su implicación en el procesos cancerígenos, parece estar demostrada.

### 5.3.1.2. Sensibilidad de la metodología utilizada para el gen *FGFR3*

Están descritas en la base de datos HGMD, 8 mutaciones responsables de un fenotipo de ACH. De las 8 descritas, nuestra metodología permite detectar 6 de ellas aunque la mutación p.Gly380Arg se encuentra en el 98% de los pacientes afectados (Shiang, 1994), de hecho es la única mutación que detectamos en nuestra población de acondroplásicos tanto postnatal como prenatalmente. Las dos mutaciones que no detectamos se encuentran descritas en la **tabla 5.1**:

- La mutación p.Ser217Cys sólo está descrita en una familia de origen chino (Zhang, 2007).
- La mutación p.Gly346Glu no provoca una ganancia de función en el receptor dimerizado como sí provoca la mutación p.Gly380Arg, por lo que He y col. ponen en duda que ésta sea una mutación patogénica que provoque un fenotipo de ACH (He, 2012).

Es decir, nuestro estudio de *FGFR3* presenta una sensibilidad alta, superior al 98% con las mutaciones estudiadas.

En el caso de HCH, se han descrito 24 mutaciones de las cuales nuestro estudio abarca 15 y entre ellas se encuentra la mutación más frecuente: p.Asn540Lys con una frecuencia de 60-65% de los pacientes afectados de HCH (Heurtz, 2006). Además estudiamos otras mutaciones frecuentes localizadas en los codones 538 y 650. Con la introducción de los nuevos cebadores para el exón 7 se amplió en 4 las mutaciones detectadas, cada una con una prevalencia del 1,5%, con lo cual se alcanza una sensibilidad de 67-72%. Con estos nuevos



cebadores se detectaba la mutación p.Tyr278Cys, con una frecuencia de detección desde 0 al 3.4% según las series (Friez, 2008; Xue, 2014).

La única mutación descrita en nuestra población de afectados es la p.Asn540Lys; 8 de las 9 debidas a el cambio C>A en el nucleótido 1620 descrita por Bellus (1995) y 1 debido al cambio A>G en el mismo nucleótido descrita por Prinos (1995). En la bibliografía también encontramos esta alta incidencia: en la serie publicada por Xue y col las mutaciones más frecuentemente encontradas son la p.Asn540Lys (76%), seguida de p.Gly380Arg y p.Lys650Gln y, por último, la p.Tyr278Cys. No detectan mutación en 6,9% de los casos. Porcentaje que sube hasta el 25,5% de los pacientes HCH en la serie de Heurtz (Heurtz, 2006).

Cabe destacar el solapamiento de genotipo y fenotipo entre ACH y HCH ya que 6,9% de los pacientes con diagnóstico de HCH presentaban la mutación p.Gly380Arg característica de los pacientes afectados de ACH, como también un 10,1% de los pacientes diagnosticados clínicamente como ACH, presentaban la mutación p.Asn540Lys característica de la HCH.

Las mutaciones no detectadas por nuestra metodología y sí descritas, se detallan en la **tabla 5.1**. De entre ellas, destaca el codon 328 con una prevalencia del 1.5% en el estudio de Heurtz (2006) que no detectamos.

**Tabla 5.1. Mutaciones no detectadas con la metodología utilizada**

	CODON	NUCLEÓTIDO	REFERENCIA
ACH	p.Ser217Cys	c.649A>T	Zhang, 2007
	p.Gly346Glu	c.1037G>A	Prinos, 1995
	p.Ser84Leu	c.215C>T	Heurtz, 2006
	p.Gln115Leu	c.344A>T	Song, 2012
	p.Arg200Cys	c.598C>T	Heurtz, 2006
HCH	p.Leu324Val	c.970C>G	Saito, 2012
	p.Asn328Ile	c.983A>T	Winterpacht, 2000
	p.Gly342Cys	c.1024G>T	Wang, 2013
	p.Ser351Cys	c.1052C>G	Baujat, 2008
	p.Glu360Lys	c.1078G>A	Baujat, 2008

El estudio de Craneosinostosis sindrómica, como se ha explicado en la introducción, implicaría el estudio de los genes *FGFR2*, *TWIST*, *RAB3* y *EFGN1*. El síndrome de Muenke es debido, exclusivamente, a la mutación en heterocigosis c.749C>G que provoca el cambio de una prolina por arginina en el codon 250 [p.Pro250Arg] por lo que, al estar contemplado el estudio de esta mutación, la sensibilidad de detección es del 100%.

### 5.3.1.3. Resultados negativos para el gen *FGFR3*

En aquellos casos en los que se obtiene un resultado negativo, para poder ofrecer estudios alternativos se requiere del fenotipo presentado por el paciente y el estudio radiológico. El estudio radiológico pediátrico es de suma importancia para el diagnóstico diferencial si bien hemos podido comprobar a lo largo del trabajo, que no es una disciplina bien desarrollada por la mayoría de los radiólogos. Al escaso conocimiento hay que sumar que el diagnóstico radiológico no es fácil incluido para patologías con cierta frecuencia como la HCH: el estudio de Prinster (2001) demostró que 2 expertos radiólogos pediátricos sólo fueron capaces de diagnosticar a 10 de los 21 niños/as afectas de HCH con diagnóstico clínico certero o/y estudio genético positivo. Destacan que la reducción de la distancia interperpendicular entre L1-5 es muy indicativa de HCH, aunque ésta también parece depender de la mutación encontrada (Thauvin-Robinet, 2003). En nuestra serie de 45 negativos, sólo 4 casos indican si hay alteración en las vértebras: en tres casos se descarta la reducción (ACH-18, ACH-159 y ACH-311) y un caso en que se describen como pequeñas y escasamente mineralizadas (ACH-185) (**tabla 4.9**).

De entre los diagnósticos diferenciales que se pueden ofertar, el estudio del gen *SHOX* en pacientes con indicación clínica de HCH y resultado negativo para el gen *FGFR3*, presenta una alta rentabilidad. En nuestra serie de 13,3%. Con lo cual es recomendable su estudio.

De los 88 casos iniciales en pacientes que presentaban al menos talla baja disarmónica, 43 resultaron positivos para el gen *FGFR3*. Trece casos de los 18 casos negativos con diagnóstico probable, tienen una base ósea en su alteración, padecen de una displasia esquelética. Como las mutaciones más frecuentes son las debidas al gen *FGFR3*, y la prevalencia de los otros diagnósticos probables es baja, parece justificado iniciar los estudios moleculares con el gen *FGFR3*. Dada la gran variabilidad fenotípica de HCH y su solapamiento en los casos más grave con ACH, la propuesta sería ante un paciente con diagnóstico clínico de HCH, se empezarían el estudio con el codón 540 pero ante un resultado negativo es necesario el estudio del resto de los exones del gen *FGFR3* y que incluya todas las mutaciones conocidas para la ACH. Del mismo modo, ante un paciente con sospecha de ACH, se debería empezar con el estudio de la mutación p.Gly380Arg aunque ante un resultado negativo, es necesario el estudio del resto de los exones, empezando por el codón 540 (Xue, 2014). Con estas premisas, la tasa de detección para un fenotipo acondroplásico sería cercana al 100% y para uno hipochondroplásico cercana al 80% (Xue, 2014).

A continuación se contemplaría el estudio del gen *SHOX* y por último, el gen *COMP*, responsable del fenotipo pseudoacondroplásico, que además constituye un diagnóstico diferencial con el HCH.

Volvemos a destacar que sería necesario un examen radiológico y clínico de nuestros pacientes que orientasen el diagnóstico clínico o permitiera sugerir un diagnóstico diferencial, previo al abordaje tanto del estudio completo de gen *FGFR3* como de otros genes candidatos.

El diagnóstico diferencial de la ACH debe hacerse con:

- Hipocondroplasia, con las formas más severas de este desorden aunque la dismorfia facial de la ACH no la presenta la HCH. Debido a la heterogeneidad fenotípica entre HCH y ACH, el estudio debe incluir, al menos, los codones más frecuentemente mutados en ambas patologías (Almeida, 2009; Heurtz, 2006; Xue, 2014).
- Displasias tanatofórica, en un primer momento al nacimiento porque ambas presentan hipoplasia torácica. Sin embargo, la letalidad de esta patología al nacimiento, es de por sí ya un elemento diferenciador. Más del 99% fallecen al nacimiento aunque, existe algún caso descrito de pacientes que han sobrevivido al periodo neonatal todos ellos con la mutación p.Arg248Cys. En el último descrito, un mujer con 21 años, presentaba una talla baja extrema con acortamiento de miembros, requería de soporte de ventilación desde los 4 meses y desde los 15 años de forma totalmente dependiente, desde los 10 presentaba *acanthosis nigricans*, entre otras alteraciones. Presentaba un retraso mental y motor grave (Nikkel, 2013).
- Pseudoacondroplasia, que presenta un enanismo con proporciones corporales que recuerdan a la ACH pero sin dismorfia facial. Una característica de esta patología que no se presenta en la ACH es la hiperlaxitud de todas las articulaciones exceptuando la del codo.
- Hipoplasia de pelo-cartílago: es otro enanismo con extremidades cortas que no presenta dismorfia facial aunque sí un pelo hipoplásico característico en cabeza, cejas y pestañas. Este desorden se trata más adelante.

El diagnóstico diferencial de la HCH incluye la ACH y la PSACH, arriba comentadas, al que en esta tesis recomendamos ampliar al estudio del gen *SHOX*.

De los 5 casos en las que se solicitaba estudio de craneosinostosis sindrómicas, 3 resultaron negativas:

- ACH-51: un varón de 2 años y su padre, ambos de origen árabe, con la solicitud de descartar el síndrome de Crouzon y el síndrome de Muenke. Sin descripción de la clínica presentada por ninguno. Se descartó la mutación c.749C>G, p.Pro250Arg responsable del síndrome de Muenke y la más frecuente dentro de las craneosinostosis. Se contactó con el médico solicitante y se decidió ampliar el estudio a los exones 7 y 8

del gen *FGFR2* y al resto de exones del gen *FGFR3*. Todos los resultados fueron negativos. En este caso sería conveniente descartar otras mutaciones en el gen *FGFR2*, ante la sospecha de síndrome de Crouzon, y si el resultado es negativo, el estudio del gen *TWIST*.

- ACH-99: un varón de 4 meses con talla de 47cm (P10-25) al nacimiento y perímetro craneal en P10 que presentaba hipotonía cervical tras parto con espátulas. En la exploración, el médico solicitante destacaba cuello corto con pliegue nuchal redundante y cabeza con morfología turricefálica con fontanela anterior amplia.

El estudio de los exones en el gen *FGFR3* fue negativo. No se pudo contactar con el médico solicitante y no se pudo ampliar el estudio. La morfología turricefálica no es característica del síndrome de Crouzon, que es debido a una craneosinostosis coronal principalmente aunque pueden verse afectados otras suturas. La turricefalia no tratada acompaña en un porcentaje alto de retraso mental y alteraciones oculares por acodamiento del nervio óptico por lo que es importante conocer si la craneosinostosis es sindrómica o no para el pronóstico. Carecemos de datos pero ante una sospecha de craneosinostosis sindrómica el estudio tendría que ser completado con la secuenciación completa del gen *FGFR2*, en primer lugar, seguido de los genes *TWIST*, *RAB3* y *EFTB1*.

- ACH-332: mujer de tres años con diagnóstico de craneosinostosis. La paciente había sido intervenida de una plagiocefalia anterior debido a craneosinostosis unilateral coronal izquierda con muy buenos resultados. Se descartó la presencia de la mutación c.749C>G, p.Pro250Arg en heterocigosis en el gen *FGFR3* responsable del síndrome de Muenke, que en su fenotipo es frecuente encontrar craneosinostosis coronal unilateral. Sin embargo, como craneosinostosis sindrómica que es y por tanto constitucional, el resultado de las operaciones no es bueno y suele requerir nuevas intervenciones. En esta paciente se detalla que el resultado es muy bueno por lo que parece indicar una craneosinostosis no sindrómica, cuya prevalencia es muy superior a las craneosinostosis sindrómicas. No se indica patología en extremidades por lo que, en todo caso y debido al solapamiento fenotípico, sería conveniente el estudio del gen *TWIST* para el síndrome de Saethre-Chotzen o del gen *FGFR2* para la sinostosis coronal aislada.

Ante la presencia de una craneosinostosis sobre todo unilateral coronal, está indicado el estudio de la mutación c.749C>G para la mutación p.Pro250Arg. Es importante el examen clínico para detectar o descartar la presencia de anomalías en miembros superiores e inferiores y así poder filiar la craneosinostosis. La probabilidad de encontrar una mutación patogénica en las formas no sindrómicas

cas, es muy baja. Mientras que en el caso de las sindrómicas sí que aumenta esta posibilidad. Si no presenta alteraciones en los miembros ni en los dedos de manos y pies, el diagnóstico diferencial del síndrome de Muenke implica el estudio del gen *TWIST* principalmente para descartar el síndrome de Saethre-Chotzen, seguido del estudio del gen *FGFR2* para descartar el síndrome de Crouzon y el de Pfeiffer (Chun, 2003). En función de las alteraciones que se encuentren en los miembros, hay que dirigir el estudio al resto de los genes de craneosinostosis sindrómicas: *FGFR2*, *FGFR1*, *EFNB1* y *RAB23*.

#### **5.3.1.4. La edad paterna**

En los casos esporádicos de afectos de ACH, la edad avanzada paterna parece ser responsable de la mayoría de ellos. De hecho, Wilkin y col. demostraron en 1998 que en el 99% de los casos la alteración tenía origen paternal, debido a una mutación en la espermatogénesis (Wilkin, 1998) y con una tasa de mutación de las más altas conocidas ( $5.5-28 \times 10^{-6}$ ) (Bellus, 1995). En el artículo de Giudicelli quedó demostrado tras encontrar 3 casos de mosaicismo germinal de esta mutación en tres pacientes con una edad superior a 80 años realizadas en biopsias testiculares de donantes fallecidos (Dekaune-Giudicelli, 2008). El primer punto de corte se puso en 35 años.

La edad paterna también es responsable de otras mutaciones en el gen *FGFR3* (Orioli, 1995), así como para el gen *FGFR2* (Moloney, 1996; Glaser, 2000). La edad paterna avanzada es la responsable principal en la aparición de enfermedades dominantes de *novο* en la descendencia, debido a la alevada cantidad de divisiones mitóticas que sufren las espermatogonias. Parece ser que el mecanismo es debido, ante una espermatogonia con una mutación de *novο*, al aumento de este clon con la edad paterna llegando a una cifra a partir de la cual esta población es suficientemente grande como para competir con las silvestres (Goriely, 2012). De hecho, a partir de los 30 años está estimado que la tasa de mutación de SNP dominantes en un hombre es de 2 mutaciones por año y que cada 16 años, esta tasa se duplica (Kong, 2012).

En nuestra serie sólo hemos podido obtener el dato de la edad paterna en 64 casos. Una explicación podría ser que muchas muestras se reciben externas al hospital y el acceso a la historia clínica del paciente está limitada.

A pesar de disponer de una serie no muy grande y estar sesgada sobre todo hacia población positiva, la edad aparece asociada a las mutaciones *FGFR3*, lo que refuerza lo reportado en los estudios citados anteriormente.

#### **5.3.1.5. Asesoramiento genético**

La situación de un paciente con un resultado molecular positivo y sus opciones reproductivas, tanto para el *probandus*, como para los progenitores del mismo en casos de formas esporádicas, está explicado en el epígrafe 5.2.1.4.

Una nueva herramienta en el paciente con una displasia ósea con una clínica no característica y con estudio del gen *FGFR3* negativo es la secuenciación masiva, bien mediante los paneles de genes bien mediante el exoma clínico, que permite el estudio de varios genes a la vez en todas sus regiones codificantes. Además también ayuda a la identificación de nuevos genes candidatos en síndromes conocidos. De modo que se puede estudiar de una sola vez y con un precio razonable, en un tiempo record, todos los genes conocidos para todas las displasias esqueléticas descritas. Sin embargo, hasta la implantación adecuado en el diagnóstico clínico asistencial de esta técnica, presenta la desventaja de aparecer variantes de significado incierto que dificultan la interpretación de los resultados y no sólo del gen que se sospecha que pueda tener relación en la patología a estudio, sino también en otros genes que *a priori* no se han tenido en cuenta. La presencia de estas variantes de significado incierto no proporcionan suficiente información a los pacientes y además suele provocar incertidumbre. Antes de la realización de estas nuevas tecnologías, en la consulta de Genética, hay que advertir claramente al paciente de las características de estas técnica para que se someta de forma voluntaria a su realización.

Es de esperar que estas variantes de significado incierto, dejen de serlo al ir aumentando el número y conocimiento de esta técnica y de los genes empleados a lo largo del tiempo. A pesar de encontrarnos en este periodo ventana, hay que dejar constancia de la enorme potencialidad de esta técnica que sin duda va a revolucionar tanto el diagnóstico final como el procedimiento para llegar a él.

Sin embargo, lo que es claramente una ventaja técnica, presenta, a nuestra forma de ver, una desventaja grande: la pérdida del examen clínico exhaustivo así como de la indicación. La solicitud del especialista que ve al paciente es un dato muy importante a la hora de plantear cómo abordar el estudio molecular. De hecho, marca el inicio del estudio ya que la indicación primera del facultativo especialista será la primera opción a estudio.

Tener acceso a la exploración clínica del paciente y las pruebas complementarias de imagen, es de suma importancia para una respuesta de calidad alta y, sin embargo, la mayoría de las veces no se tiene acceso. Esta calidad alta también obliga al facultativo de laboratorio conocer las características genéticas de la enfermedad a estudio, y de esa forma debe recomendar el estudio de otras mutaciones/otros genes ante un resultado negativo. La falta de información por parte del clínico y la baja implicación por parte del facultativo del laboratorio que no se le informa de esa clínica, puede llevar a errores como el ocurrido en el caso ACH-108 de esta serie, en donde en la ecografía del 3<sup>er</sup> trimestre se sospechó una HCH. La gestante se sometió a una prueba invasiva y se realizó un estudio de las mutaciones más frecuentes para HCH: codon 540 y 650. El estudio fue negativo y el embarazo siguió su curso. Al nacimiento, el fenotipo era sugerente de ACH y el estudio molecular lo confirmó. Hubiese sido necesario un genetista que hiciese de nexo entre el obstetra y el laboratorio con un asesoramiento ge-

nético que informase por un lado de la sensibilidad diagnóstico de las mutaciones para el HCH (en nuestro caso del 67-72%) y por otro la de indicar el estudio del codon 380 para ACH por los siguientes motivos:

- el solapamiento del fenotipo ACH más leve con el más agresivo de HCH,
- el diagnóstico prenatal de HCH es prácticamente accidental frente al de ACH,
- someterse a una prueba invasiva es suficiente indicación para ampliar el estudio,
- el estudio molecular ACH tiene una alta rentabilidad diagnóstica: una única mutación, p.Gly380Arg, se encuentra en el 98% de los pacientes afectados de ACH.

Este asesoramiento es todavía más importante cuando la patología que se sospecha se detecta en el periodo prenatal

### **5.3.2. Gen *FGFR2*: síndrome de Apert y de Crouzon**

#### **5.3.2.1. Resultados para el gen *FGFR2***

El caso positivo presentaba la mutación más frecuente y primera reportada: c.758C>G [p.Pro253Arg], publicada en 1995 por Park y por Wilkie, *de novo* (Park, 1995; Wilkie, 1995). Como ocurre en el gen *FGFR3*, está descrito que las mutaciones *de novo* tienen origen en el alelo paterno y van asociadas a edad paterna avanzada (Moloney 1996). En este caso el padre tenía 48 años en el momento de la concepción. No teníamos la descripción de la clínica del paciente aunque el fenotipo del síndrome de Apert es fácilmente distinguible clínicamente por la presencia de craneosinostosis y sindactilia grave que implica tanto hueso como piel en manos y pies, como rasgos principales.

Los dos casos negativos no tenían como primera indicación el estudio del gen *FGFR2*:

- ACH-51: varón de 2 años y muestra de su padre, para estudio de síndrome de Crouzon y de Muenke. Todos los estudios realizados fueron negativos. Por el origen étnico del paciente (árabe), con frecuente consanguinidad, se podría pensar en una craneosinostosis recesiva: síndrome de Carpenter pero presenta otras alteraciones esqueléticas como son la polidactilia postaxial, ausencia de coxis y escoliosis; muy llamativas y que no están descritas ni en el paciente ni en su padre. El que el padre y el hijo presenten clínica similar descarta la posibilidad de una enfermedad recesiva y señala más hacia un patrón dominante. Para descartar el síndrome de Crouzon sería necesario ampliar el estudio a todo el gen *FGFR2*, segui-



do del resto de diagnóstico diferenciales que se comenta en el siguiente epígrafe.

- ACH-332: una mujer de 3 años intervenida de plagiocefalia anterior por una craneosinostosis unilateral coronal izquierda con muy buenos resultados. Todos los estudios realizados fueron negativos. El diagnóstico más probable es de craneosinostosis no sindrómica cuyo estudio mutacional tienen una tasa de detección baja. Están descritas varias mutaciones asociadas a craneosinostosis no sindrómicas en los codones 290, 314, 315, 333 y 351 del gen *FGFR2*; por lo que se decidió su estudio, todos con resultado negativo. Sin embargo, en esta paciente es recomendable realizar estudios adicionales, principalmente del gen *TWIST* tanto en su secuenciación completa como mediante técnica de MLPA, al ser el gen candidato primero en las craneosinostosis no sindrómicas.

### 5.3.2.2. Sensibilidad de la metodología utilizada para el gen *FGFR2*

El estudio de los dos exones amplificados por nuestra metodología del gen *FGFR2*, que corresponden a las regiones de la proteína IIIa y IIIb, da una sensibilidad superior al 90% para el síndrome de Apert. Ya en las series de Park y Wilkie donde se describen por primera vez las 2 mutaciones causantes de la enfermedad (p.Ser252Trp y p.Pro253Arg), se dan sensibilidades del 97% (sólo hubo un paciente que no se pudo confirmar molecularmente de 37 afectados) y del 100% (40 pacientes afectados y todos positivos) (Park, 1995; Wilkie, 1995). Estos porcentajes se han mantenido en las series publicadas por lo que la recomendación es, ante un diagnóstico clínico de síndrome de Apert, realizar el estudio de los codones 252 y 253 del gen *FGFR2* (Chun, 2003). En este caso, la metodología utilizada en esta tesis cumple las recomendaciones publicadas.

Ante un resultado negativo y la sospecha clínica firme de síndrome de Apert, se debe estudiar el gen completo incluidos regiones intrónicas adyacentes ya que están descritos dos pacientes con inserciones de elementos Alu: uno en la región 5' del exón 9 (región IIIc de la proteína) consistente en 368 pares de bases (c.1119-3\_-4insAlu) y otro en el interior del propio exón 9 con 350 pares de bases (c.1220\_1221insAlu) (Oldridge, 1999).

El diagnóstico diferencial del síndrome de Apert, ante un resultado negativo de la secuenciación completa del gen *FGFR2*, debe realizarse con los síndromes de Carpenter, Saethre-Chotzen y de Pfeiffer tipo II, cuyas características generales se encuentran en la tabla de la introducción (**tabla 1.2**).

Además de las mutaciones responsables del síndrome de Apert, en estos dos exones 7 y 8 se concentra el mayor número de mutaciones para varios síndromes, incluido el de Crouzon (Kan, 2002). En la serie publicada por Kan, de los 36 pacientes diagnosticados clínicamente de síndrome de Crouzon, 28 presentaban una mutación en *FGFR2* (77,8%), de las cuales 22 (78,6% de las 28 mutaciones totales) de estas mutaciones se encontraban entre los codones 251 y 360, cubiertos con la metodología utilizada en esta tesis. Por lo tanto, se detecta más del 75% de las mutaciones descritas. Ante un resultado negativo es recomendable ampliar el estudio con el exón 9 (que traduce para la región IIIc), seguido del estudio del resto de exones de *FGFR2* (Johnson, 2011).

En *GeneReview* se indica que el estudio del gen *FGFR2* explica el 100% de los casos de pacientes con síndrome de Crouzon, sin embargo, en las últimas series publicadas se destaca que sólo el 50% de los síndromes de Crouzon diagnosticados clínicamente presentan mutación en este gen *FGFR2*, lo que representa una tasa de confirmación molecular baja ([www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1455/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1455/); Helman, 2014).

El estudio diferencial del síndrome de Crouzon debe hacerse con (Chun, 2003; Lajeunie, 2006; Johnson, 2011):

- Síndrome de Pfeiffer en su forma más leve (tipo I),
- Síndrome de Jackson-Weiss,
- Mutación puntual p.Pro250Arg del gen *FGFR3* por el síndrome de Muenke, así como de la p.Ala 391Glu por el síndrome de Crouzon con *acanthosis nigricans*.
- Síndrome de Saethre-Chotzen: la secuenciación y estudio de MLPA del gen *TWIST*.

La implantación de las nuevas tecnologías, como la secuenciación masiva, ha permitido el estudio de craneosinostosis sindrómicas en aquellos casos en los que no parecía una clínica sugerente de un síndrome concreto por la variabilidad fenotípica observada, y de no sindrómicas de una forma extensa. Pero incluso así parece apropiado realizar el estudio mutacional de forma secuencial, en cascadas, con el objetivo de optimizar tiempo y recursos materiales. En esta línea tenemos la propuesta de Paumard-Hernández sobre una población de 182 pacientes españoles afectados de craneosinostosis, en la que encuentran mutación responsable de la patología en el 62% de los casos. Se estudian 5 genes (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST2* y *EFNB1*) con una metodología en cascada desde las mutaciones más frecuentes a las menos en la craneosinostosis, consiguiendo

así un 92% de mutaciones en el nivel 1, un 7% en el nivel 2 y un 1% en el nivel 3 (Paumard-Hernández, 2015).

### 5.3.2.3. Asesoramiento genético

Ante un paciente afecto de síndrome de Apert y confirmado molecularmente, se puede realizar el asesoramiento genético reproductivo a los progenitores como el solicitado en el caso ACH-118. Este caso es un lactante producto de una ovodonación afecto de síndrome de Apert. Los progenitores querían saber la posible recurrencia para otro posible diagnóstico. La madre tiene 44 años y el padre 48 años en el momento del nacimiento.

El riesgo de recurrencia en esta pareja no afecta, ante una enfermedad autosómica dominante con penetrancia completa y congénita, es muy bajo y por un ejercicio de prudencia, confinado al mosaicismo germinal, aunque sólo hay un caso descrito en la bibliografía (Allanson, 1986). Las opciones reproductivas de esta pareja, siguiendo con la reproducción asistida, serían:

- Una nueva ovodonación,
- Una donación de embriones, con semen de donante joven que disminuye la probabilidad de mutaciones asociadas a la edad paterna,
- Diagnóstico genético preimplantatorio, aunque dada la edad de la madre queda excluida de la cartera de servicios pública.

Una vez instaurado el nuevo embarazo y si existe ansiedad materna, dada la baja recurrencia se debería ofertar un diagnóstico prenatal no invasivo mediante ADN fetal en sangre materna. Si esta técnica no está disponible, se puede realizar un diagnóstico prenatal invasivo teniendo en cuenta los riesgos-beneficios de la técnica utilizada. En este caso ante una demanda de diagnóstico confirmatorio sería recomendable la amniocentesis, al tener menos riesgo de pérdida fetal.

### 5.3.3. Gen *COMP*: pseudoacondroplasia

#### 5.3.3.1. Resultados para el gen *COMP*

Las mutaciones encontradas en los 2 casos positivos están ampliamente descritas en la literatura: ACH-156 con la mutación c.1336G>A [p.Asp446Asn] en heterocigosis en el exón 13 del gen *COMP* (Maddox, 1997) y ACH-255 con la mutación más frecuente c.1417\_1419delGAC [p.Asp473del] en heterocigosis en el exón 13 del gen *COMP* (Hecht, 1995).

La mutación c.1417\_1419delGAC [p.Asp473del] produce un fenotipo más severo de PSACH con tallas finales más bajas (alrededor de -6SDS), mayor limitación en los movimientos y deformidad en las articulaciones más severas (Ikewa-

ga, 1998). Sin embargo, no podemos conocer si éste fenotipo más grave es el presentado por nuestro caso porque no se describe nada de su clínica.

Entre los tres casos negativos, 2 casos procedían de las muestras remitidas desde la República Dominicana anteriormente mencionadas, con estudios realizados a partir de células bucales, de pacientes clínicamente bien definidos:

- ACH-64: sólo se pudo descartar mutaciones en el exón 13 por falta de muestra.
- ACH-79: el estudio de los tres exones resultó negativo.

Ante este resultado negativo, con el diagnóstico clínico de PSACH y, a pesar de no aportar la clínica presentada por los pacientes sería conveniente el estudio del resto de exones del gen *COMP* para descartar otras mutaciones.

El tercer caso, ACH-102, es el caso de un niño de Santo Domingo de 18 meses de edad con desproporción corporal y la solicitud de diagnóstico diferencial entre HCH e PSACH con un resultado negativo en los 3 exones estudiados.

También se realizó el estudio de este gen a 2 casos que no presentaban una displasia ósea bien definida:

- ACH-119: varón de 27 años con talla baja y desproporción por micromelia. Solicita descendencia no afecta.
- ACH-210: varón con diagnóstico de displasia metafisaria sin filiar. Los estudios realizados en esta tesis, secuenciación del gen *FGFR3* y *COMP* así como estudio mediante MLPA de grandes deleciones/duplicaciones del gen *SHOX*, se pueden utilizar para el diagnóstico diferencial de su patología pero no para su diagnóstico.

La metodología utilizada detecta un 78% de las mutaciones de pacientes con PSACH lo que no excluye, pero hace menos probable, el diagnóstico en los dos casos sin clínica sugerente (ACH-119 y ACH-210) así como en el diagnóstico diferencial (ACH-102). En estos casos no es recomendable ampliar el estudio hasta una nueva re-evaluación clínica con datos de imagen.

En el diagnóstico diferencial de la PSACH, hay que tener en cuenta:

1. La displasia epifisaria múltiple (MED): pueden presentar clínica solapada en los inicios de la infancia, por lo menos la forma alélica con el gen *COMP*, pero la PSACH es más severa. La talla final de MED varía entre baja y normal. La PSACH siempre es una talla baja patológica (<150cm).

2. Acondroplasia: en las formas menos severas de ACH y en los primeros años de vida. Sin embargo, la dismorfia facial es suficientemente característica para diferenciar los dos síndromes.
3. Hipocondroplasia: con un diagnóstico que, como en la PSACH, ocurre pasados los dos primeros años de vida, el diagnóstico diferencial con este desorden es necesario. Si bien, en edades más avanzadas, complicaciones como la hiperlaxitud articular, el dolor y la osteoartritis temprana en la PSACH diferencian ambos síndromes.
4. Hipoplasia de pelo-cartílago: también en etapas iniciales de la enfermedad.
5. Displasias espondiloepifisarias o espondiloepimetafisarias: radiológicamente pueden aparecer signos solapados.

### 5.3.3.2. Sensibilidad de la metodología utilizada para el gen *COMP*

Aproximadamente el 90% de las mutaciones descritas como patogénicas y, por tanto, responsables de la PSACH, se encuentran entre los exones 8 al 14 del gen *COMP*, que codifican los 7 dominios de repetición tipo III (Briggs, 2002; Jackson, 2011).

Medimos la sensibilidad de nuestra metodología comparándolo con el artículo de Briggs de 2014, donde se recogen las mutaciones encontradas en 300 pacientes afectados de PSACH o MED publicadas hasta día de hoy. Entre los codones 268 a 528, que codifican los 7 dominios tipo III, se encuentran 261 de las 300 mutaciones descritas. La mutación recurrente c.1417\_1419delGAC [p.Asp743del] en el exón 13 se encontró en 49 de 300 pacientes (16,3%), con un fenotipo severo de PSACH.

Con el estudio de los exones 10, 13 y 14 que hemos desarrollado en esta tesis, se es capaz de detectar 196 de las 261 en esa región conservada para pacientes con PSACH o MED, que constituyen el 75% de las 261 mutaciones localizadas en esta región caliente, y el 65% respecto a las 300 mutaciones descritas.

En este artículo describen 182 mutaciones en pacientes afectados de PSACH, de ellas esta metodología detectaría 142, que constituye el 78,02% (Briggs, 2014). Es decir, es un porcentaje elevado. De hecho, hay autores que sugieren un primer cribado de mutaciones en el gen *COMP* con el estudio de los exones 10 y 13 (Kennedy, 2005).

En las series publicadas, existen pacientes con diagnóstico clínico de PSACH en los que no se encuentra ninguna mutación en el gen *COMP*. El porcentaje va-

ría entre el 38,46% de Deere (1999) al 3,57% de Jackson (2011). A pesar de este primer dato de 1/3 de pacientes afectados de PSACH sin estudio molecular confirmatorio en el gen *COMP*, probablemente por el año en el que se describió, hoy en día se considera que el porcentaje de mutaciones patogénicas en gen *COMP* para pacientes con diagnóstico clínico certero es mayor del 95% (Kennedy, 2005; Jackson, 2011). De hecho, en aquellos casos con estudio molecular negativo del gen *COMP* en pacientes afectados de PSACH, se recomienda la re-evaluación clínica más exhaustiva ya que, muy previsiblemente, serán afectados de otra patología ósea distinta (Kennedy, 2005).

### **5.3.3.3. Asesoramiento genético**

En los 5 casos con sospecha de PSACH, todos ellos infantes, se solicitaba para confirmación diagnóstica. En los dos casos positivos, se puede realizar un asesoramiento genético personal, indicando la mayor severidad de las manifestaciones en el caso ACH-255 por la mutación encontrada e indicando el patrón de herencia autosómica dominante. Se suele indicar que se puede tener descendencia libre de la enfermedad, pero por la edad de los pacientes, tras esta indicación, se recomienda acudir a una consulta de Genética Clínica cuando deseen tener descendencia para recibir información actualizada.

A los progenitores de estos pacientes, tendrían un asesoramiento genético como alguno ya comentado, con una recurrencia confinada como máximo al mosaicismo germinal y la posibilidad de confirmar la ausencia de la enfermedad en futuros embarazos, por distintas técnicas, al identificarse la mutación responsable de la enfermedad.

### **5.3.4. Gen *SLC26A2*: displasia epifisaria múltiples recesiva**

#### **5.3.4.1. Resultados para el gen *SLC26A2***

Los progenitores del caso ACH-228, solicitaban una segunda opinión del diagnóstico molecular que se había realizado a lo largo del embarazo. Para ello, lo primero fue volver a extraer ADN de cada uno y reproducir la alteración en el exón 3 del gen *SLC26A2* llegándose a la conclusión de que la *probandus* presentaba la mutación c.835C>T; p.Arg279Trp, en homocigosidad en el exón 3 del gen *SLC26A2* por isodisomía completa paterna del cromosoma 5. El padre era portador de esta mutación en heterocigosis y la madre presentaba un patrón normal bialélico en esta región.

En un primer momento, esta mutación se describió en un feto con un fenotipo de atelosteogénesis tipo 2 (Hästbacka, 1996). Ese feto presentaba, además de la p.Arg279Trp, una delección de una adenina en el nucleótido 1751 que pro-

vocababa un cambio en la pauta de lectura con el resultado de un codon de parada temprano 9 aminoácidos más tarde ( $\Delta A1571$ ), lo que truncaba a la proteína en un 20% de su extensión. Las mutaciones que truncan el transportador se consideran graves y se asocian a fenotipos más severos y letales (Barbosa, 2010).

La mutación p.Arg279Trp es una de las 4 más frecuentes en Europa, exceptuando la mutación fundadora finlandesa c.-26+2T>C (Barbosa, 2010; GeneReviews Multiple Epiphyseal Dysplasia, Recessive). Está considerada una mutación con efecto ligero sobre el transportador por lo que en forma homocigota da lugar a una clínica rMED y en asociación con una severa/moderada da lugar a la forma de displasia diastrófica (Barbosa, 2010). La conjunción de p.Arg279Trp junto a c.-26+2T>C da lugar a un fenotipo más similar a la rMED que a la displasia diastrófica (Mäkitie, 2015).

Como se explica en la introducción, Superti-Furga y col. describieron en 1999 una nueva entidad clínica más leve que la displasia diastrófica y que presentaba la mutación c.835C>T [p.Arg279Trp] en homocigosis (Superti-Furga, 1999). Quedó bien establecido esta entidad denominada displasia epifisaria múltiple recesiva, con otra nueva serie de pacientes en 2001 en la que se demostró que la mutación p.Arg279Trp en homocigosis daba lugar a un fenotipo rMED y que esta mutación en combinación con otra segunda grave, daba un fenotipo de displasia diastrófica, aunque había cierto solapamiento en la clínica porque se describían casos de displasia diastrófica con homocigosidad para esta mutación (Rossi y Superti-Furga, 2001). Esta heterogeneidad fenotípica debe estar influenciada por una tercera mutación en el gen que haga más agresiva la alteración p.Arg279Trp, otras variantes en otros genes y/o efectos epigenéticos (Zechi-Ceide, 2013).

En la misma base de datos profesional HGMD, se indica que la mutación es patogénica pero con un riesgo deletéreo medio.

Por lo tanto, el diagnóstico emitido fue de afecta de displasia epifisaria múltiple recesiva. Si bien la escoliosis que presenta la *probandus* es temprana y grave, no típica de la rMED y sí de la displasia diastrófica, por lo que es más correcto un diagnóstico clínico de afecta de alteración en el gen *SLC26A2* con una clínica entre la rMED y la displasia diastrófica.

Queremos destacar que estas dos formas de displasia no suelen asociar los signos prenatales que esta paciente tuvo en su periodo prenatal. Es significativo la sonolusencia nuchal superior a 6 mm así como el polihidramnios que más tarde desarrolló el feto. Podría explicarse por la alteración renal presentada por la paciente e incluso por la CIA, aunque ambas alteraciones no tienen por qué con-



llevar clínica ya que en su desarrollo se ha visto que eran alteraciones menores que no han requerido intervención. Las sonoluscencias nucales tan elevadas suelen acompañar de clínicas severas. Queda patente que el diagnóstico prenatal es difícil de manejar.

El diagnóstico clínico de rMED/EDM4 no es compartido por todos los profesionales ya que la familia consulta a un especialista en Rehabilitación y Medicina Física, experto en displasias óseas, que tras valoración a los 27 meses, diagnostica una displasia metafisaria múltiple basándose en que las series radiográficas no muestran las características de la displasia epifisaria múltiple como son que presenta escasa desaxación de las extremidades inferiores, ausencia de platiespondilea, ausencia de alteración de las epífisis de los huesos largos y presencia de alteración en todas las metáfisis de los huesos largos. De hecho, este facultativo recomendó una nueva revisión del estudio genético por lo que los progenitores acudieron a un tercer centro de Genética Clínica donde continúa en seguimiento. No tenemos acceso al diagnóstico realizado por este centro.

De nuevo este posible diagnóstico de displasia metafisaria múltiple tampoco es compartida por todos los especialistas. Consultado el caso en radiología infantil se indicó que ésta no era específica ni de displasia metafisaria ni de displasia epifisaria y se describió como modelamiento posterior del cráneo con órbitas algo elevadas, índices ilíacos aumentados, maxilar plano con hipoplasia de la rama vertical, escoliosis lumbar de concavidad derecha, metáfisis femorales algo anchas, peronés algo cortos y disminución del ángulo del carpo. Ninguno de estos signos son característicos de estas dos patologías.

Parece que existe una correlación bien establecida entre la mutación p.Arg279Trp en homocigosis y la presencia de displasia epifisaria múltiple receptiva/displasia diastrófica. Sin embargo, también queda patente que la afectación es variada y hay otros genes, otros mecanismos epigenéticos, tal vez su propia disomía paterna completa, que pueden modular el fenotipo. Si bien radiológicamente no presenta signos claros de displasia epifisaria, tampoco parece correcto desechar por completo este diagnóstico. El diagnóstico molecular ayuda a la caracterización de las displasias óseas, de hecho se apoya en él para el diagnóstico clínico dada la gran cantidad de signos que solapan entre sí (Superti-Fuga, 2001). Como la mayoría de las displasias esqueléticas, el paso del tiempo y la evolución de la paciente así como nuevos signos que puedan aparecer, ayudarán a discernir esta situación.

La presencia de disomías parentales en los cromosomas ha resultado más alta de lo esperado. La forma segmentada de disomía está más favorecida y se

encuentra en mayor proporción que la disomía de todo un cromosoma, que queda relegada a un 0,13% (Wang, 2015).

Hasta la fecha hay descritos menos de medio centenar de enfermedades recesivas debidas a disomías uniparentales. Con la implicación única del cromosoma 5 se han encontrado 5 casos:

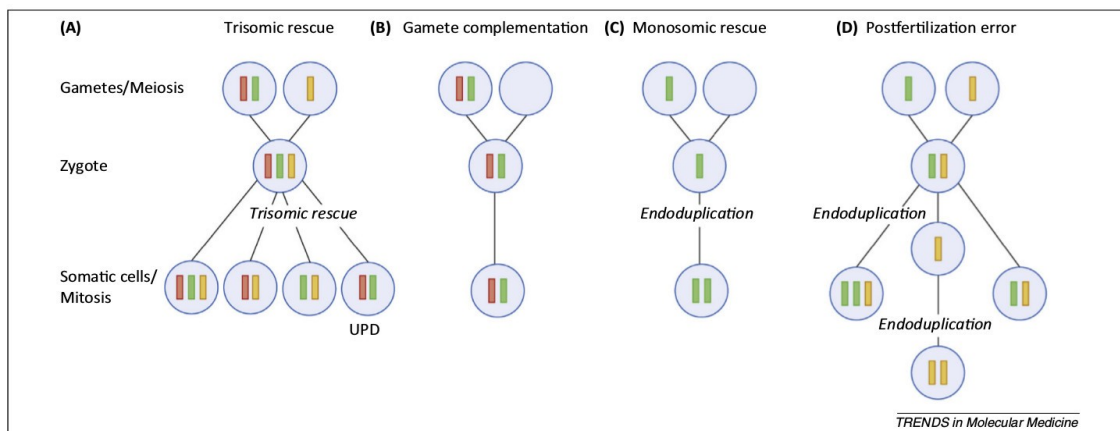
- Síndrome de Netherton, un tipo de ictiosis, por isodisomía maternal completa del cromosoma 5 (Numata, 2014),
- Síndrome de Netherton por una isodisomía maternal segmentaria con una mutación *de novo* en ese alelo materno (Lin, 2007),
- Atrofia muscular espinal por isodisomía paterna completa (Brzustowicz, 1994),
- Esquizofrenia infantil por isodisomía paterna segmental 5q32-qter (Seal, 2006),
- Retraso psicomotor y del crecimiento, macrocefalia e hipospadias, en un varón de 1 año con una isodisomía segmental de origen desconocido (Lenzini, 2015).

El mecanismo por el cual se produce una disomía uniparental se supone que puede ser debido a cuatro supuestos: a) rescate trisomía: en un embrión con trisomía de un cromosoma, de forma azarosa se elimina el del progenitor que sólo aporta uno quedando los dos cromosomas del mismo progenitor; b) complementariedad de gametos: en línea germinal hay un gameto con ausencia de un cromosoma y se fecunda con otro gameto que tiene los dos cromosomas, justo el mismo par que al otro gameto le falta; c) duplicación de una monosomía en un embrión: ante la falta del cromosoma de un progenitor se duplica entero ese cromosoma; d) error postfertilización en donde un embrión con dos alelos correctos, duplica su contenido y divide en dos embriones: uno tendrá 3 alelos, y se produce un rescate de una trisomía, y otro sólo tiene un alelo y se produce un rescate de una monosomía (Engel, 2006; Eggermann, 2015) (**figura 5.3**).

En función del mecanismo de no disyunción que ocurra, el resultado es una heterodisomía, una isodisomía o una mezcla de ambos. En el caso que nos ocupa, el mecanismo sería el tercero, el rescate de una monosomía en un óvulo fecundado con la duplicación de todo el cromosoma 5 paterno (**figura 5.3c**).

Las disomías uniparentales segmentales tienen otro mecanismo y son el resultado de un entrecruzamiento somático anómalo (Engel, 2006).

Figura 5.3. Mecanismos de producción de disomía uniparental. Tomado de Eggermann 2015



Al presentar la paciente dos cromosomas idénticos está en riesgo de desarrollar cualquier enfermedad cuyo gen se encuentre en este cromosoma 5, presente una herencia recesiva y su padre sea portador (**tabla 5.2**). Como se puede observar en la lista, la mayoría presentan una herencia recesiva por lo que tienen un riesgo aumentado frente a la población general.

El diagnóstico diferencial del rMED debe realizarse con las siguientes entidades (Anthony, 2015):

- El resto de los subtipos de MED.
- Displasia diastrófica: forma más grave que la rEMD con una afectación severa de la columna vertebral
- Enfermedad de Legg-Calvé-Perthes: enfermedad que afecta a la cadera, típicamente de forma unilateral (>80% casos) mientras que MED siempre es bilateral. No se ven afectados otras articulaciones como la rodilla o el hombro. Los individuos presentan una talla normal.
- Displasia espondiloepifisarias: presentan talla baja con cifoescoliosis y pueden presentar alteraciones en la visión y el oído.
- Hipotiroidismo congénito: el estudio de la función tiroidea lo confirma.
- Mucopolisacaridosis: gran grupo de enfermedades de depósito con una variabilidad en la expresión alta. Sería el caso de las formas más leves con afectación esquelética. Un estudio de metabolitos en orina descartaría la mayoría de los casos.
- Pseudocondroplasia: ya vista con anterioridad

Tabla 5.2. Genes presentes en el cromosoma 5

GEN	ENFERMEDAD	TIPO DE HERENCIA			
		DOMINANTE	RECESIVA	DESCONOCIDA	NO ASOCIA
<i>ADAMTS2</i>	Síndrome de Ehlers-Danlos tipo 7C		✓		
<i>ALDH7A1</i>	Epilepsia dependiente de piridoxina		✓		
<i>AMACR</i>	Deficiencia de la enzima racemasa alfa-metilacil-CoA		✓		
	Defectos en la síntesis de ácidos biliares congénita		✓		
<i>ANKH</i>	Condrocálcinos 2	✓			
	Displasia craneometáfiseal	✓			
<i>APC</i>	Adenoma periampular, somático			✓	
	Poliposis adenomatosa	✓			
	Síndrome polipósico-tumor cerebral 2	✓			
	Cáncer colorrectal, somático	✓			
	Enfermedad de Desmond	✓			
	Síndrome de Gardner	✓			
	Cáncer gástrico, somático		✓		
	Hepatoblastoma, somático	✓			
<i>ARSB</i>	Mucopolisacaridosis tipo 6		✓		
<i>CSF1R</i>	Leucoencefalopatía difusa hereditaria con esferocitosis		✓		
<i>CTNND2</i>	No asocia				✓
<i>DNAH5</i>	Disquisia ciliada primaria 3		✓		
<i>ERAP1</i>	No asocia				✓
<i>ERCC8</i>	Síndrome de Cockayne tipo A		✓		
	Síndrome sensible a UV tipo 2		✓		
<i>F12</i>	Angioedema hereditario tipo 3		✓		
	Deficiencia de factor XII		✓		
<i>FAM134B</i>	Neuropatía sensorial y autonómica hereditaria tipo IIB		✓		
<i>FBN2</i>	Aracnodactilia contractural congénita	✓			
	Degeneración macular de inicio precoz	✓			
<i>FGF10</i>	Aplasia de la glándula lacrimal y salival	✓			
	Síndrome de LADD	✓			
<i>FGFR4</i>	Capacidad metastásica del cáncer			✓	
<i>FLT4</i>	Linfedema hereditario IA	✓			
	Hemangioma capilar infantil, somático	✓			
<i>GABRA1</i>	Encefalopatía epiléptica infantil tipo 19	✓			
<i>GHR</i>	Enanismo de Laron		✓		
	Insensibilidad parcial a la hormona de crecimiento	✓			
<i>GLRA1</i>	Hiperekplexia hereditaria 1	✓	✓		
<i>GM2A</i>	Gangliosidosis variante AB o GM2		✓		
<i>GPR98</i>	Convulsiones febriles familiar tipo 4			✓	
	Síndrome de Usher tipo 2C		✓		
<i>GRM6</i>	Ceguera nocturna congénita 1B		✓		
<i>HARS2</i>	Síndrome de Perrault 2		✓		
<i>HEXB</i>	Enfermedad de Sandhoff		✓		
<i>HINT1</i>	Neuropatía axonal y neuromiotonía		✓		
<i>HSD17B4</i>	Síndrome de Perrault 1		✓		
	Deficiencia de proteína D-bifuncional		✓		
<i>IL7R</i>	Inmunodeficiencia severa combinada		✓		
<i>IRGM</i>	Enfermedad intestinal inflamatoria/Enfermedad de Chron			✓	
<i>MAP3K1</i>	Disgenesia gonadal46,XY	✓			
<i>MATR3</i>	Esclerosis lateral amiotrófica	✓			
<i>MCCC2</i>	Deficiencia de 3-metilacetoni-CoA carboxilasa		✓		
<i>MOC52</i>	Deficiencia B de cofactor molibdeno		✓		

GEN	ENFERMEDAD	TIPO DE HERENCIA			
		DOMINANTE	RECESIVA	DESCONOCIDA	NO ASOCIA
<i>MSX2</i>	Craneosinostosis tipo 2			✓	
	Fontanela parietal 1	✓			
	Fontanela parietal con displasia celidocraneal	✓			
<i>MTRR</i>	Anemia megaloblástica con homocistinuria		✓		
<i>MYOT</i>	Distrofia muscular de caderas tipo 1A	✓			
	Miopatía miofibrilar			✓	
<i>NIPBL</i>	Miopatía con cuerpos esferoides	✓			
	Síndrome de Cornelia de Lange	✓			
<i>NNT</i>	Deficiencia de glucocorticoides		✓		
<i>NPM1</i>	Leucemia y mieloides aguda, somática	✓			
<i>NSD1</i>	Síndrome de Beckwith-Wiedemann	✓			
	Síndrome de Sotos	✓			
	Leucemia y mieloides aguda, somática	✓			
<i>OXCT1</i>	Deficiencia en succinil CoA-3-oxoácido CoA transferasa		✓		
	Calcificación de los ganglios basales idiopática	✓			
<i>PDGFRB</i>	Desorden mieloproliferativo con eosinofilia	✓			
	Miofibromatosis infantil		✓		
<i>PIK3R1</i>	Agalmaglobulinemia		✓		
	Inmunodeficiencia	✓			
<i>PROPI</i>	Síndrome de SHORT	✓			
	Deficiencia de hormona pituitaria		✓		
<i>RASA1</i>	Síndrome de Parkes Weber	✓			
	Carcinoma de células basales, somática	✓			
	Malformación capilar y arteriovenosa	✓			
<i>SAR1B</i>	Enfermedad de Anderson		✓		
	Cardiomiopatía dilatada		✓		
<i>SDHA</i>	Síndrome de Leigh		✓		
	Deficiencia del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial		✓		
	Paragangliomas	✓			
<i>SGCD</i>	Cardiomiopatía dilatada	✓			
	Distrofia muscular de caderas tipo 2F		✓		
<i>SH3TC2</i>	Charcot-Marie-Tooth tipo 4C		✓		
	Mononeuropatía del nervio medio	✓			
<i>SIL1</i>	Síndrome de Marinesco-Sjogren		✓		
<i>SLC1A3</i>	Ataxia episódica	✓			
<i>SLC22A5</i>	Deficiencia en carnitina sistémica primaria		✓		
<i>SLC45A2</i>	Albinismo oculocutáneo tipo IV		✓		
<i>SMN1</i>	Atrofia espinal muscular		✓		
<i>SMN2</i>	Modificador de AME tipo III		✓		
<i>SPINK5</i>	Atopia	✓			
	Síndrome de Netherton		✓		
<i>SQSTM1</i>	Síndrome de Paget	✓			
	Demencia frontotemporal y/o esclerosis lateral amiotrófica	✓			
<i>TGFB1</i>	Síndrome de Treacher-Collins	✓			
	Diskeratosis congénita	✓			
<i>TERT</i>	Fibrosis pulmonar y/o fallo de médula ósea	✓			
	Susceptibilidad a melanoma maligno cutáneo	✓			
<i>TGFB1</i>	Distrofia corneal	✓	✓		
<i>TMEM173</i>	Vasculopatía asociada con STING infantil	✓			
<i>TTC37</i>	Síndrome trihepatointestinal		✓		
<i>VCAN</i>	Síndrome de Wagner	✓			

#### **5.3.4.2. Asesoramiento genético**

Este diagnóstico final permitió un asesoramiento genético familiar y reproductivo distinto al de progenitores portadores de mutación en una enfermedad autosómica recesiva: la probabilidad de recurrencia en futuras gestaciones es muy baja, nunca reportada, por lo que no se recomienda ninguna técnica reproductiva, ni previa al embarazo ni en un futuro embarazo en curso. Sin embargo, a pesar de que el hallazgo genético es, en la práctica, no recurrente en otro embarazo, la experiencia nos indica que se vive el siguiente embarazo con una ansiedad materna/paterna muy elevada que repercute en esa nueva gestación. Al conocerse las mutaciones y el mecanismo por el que se ha producido la enfermedad en la paciente, se puede ofrecer un diagnóstico prenatal no invasivo, mediante la detección de la mutación paterna en el ADN fetal circulante en la sangre periférica materna; y de detectarse esta mutación, se puede realizar el diagnóstico genético prenatal, valorando las beneficios-desventajas de una prueba invasiva fetal con tan baja probabilidad de recurrencia.

Este caso es un ejemplo de la dificultad que los estudios genéticos pueden plantear. A los progenitores de la paciente les supuso un gran desasosiego la incertidumbre de la afectación del feto en el embarazo tras los distintos diagnósticos que se le dieron durante el mismo, empezando por una alteración cromosómica y, ante un resultado normal, una displasia letal: la atelosteogenesis tipo 2. Ante el nacimiento de una niña con alteraciones óseas no letales, se volvió a cambiar el diagnóstico a displasia diastrófica. Según relatan los progenitores, tras recibir el informe del estudio molecular de ellos, acudieron a dos genetistas para su interpretación. Al no entender el estudio molecular, acuden al servicio de Genética Clínica (3ª consulta de genética) para nuevos estudios. Tras el diagnóstico molecular de isodisomía paterna del cromosoma 5 y diagnóstico de displasia epifisaria múltiple recesiva, recibieron un consejo genético escrito y verbal. Con este diagnóstico se le está realizando un seguimiento en el Servicio de Pediatría de la FJD, aunque también tiene un seguimiento en varias disciplinas de otros hospitales, uno de los cuales solicitó la opinión de un especialista en Rehabilitación, experto en displasias óseas, que indicó una displasia metafisaria, y recomendó un nuevo estudio genético por lo que acuden a una 4ª consulta para esa nueva valoración a la que no hemos tenido acceso.

No siempre, y a pesar de las habilidades comunicativas que se pueda tener, el consejo genético resulta satisfactorio. Cómo viva la paciente y su entorno familiar la enfermedad es un punto clave en todo el proceso (Gollust, 2015). El fracaso en tres genetistas de distintos centros para explicar qué significa lo encontrado en la paciente no puede deberse exclusivamente a la pobre comunicación de

éstos. El seguimiento por dos servicios de Pediatría de la niña además de no ser una práctica recomendable por el coste en tiempo y en recursos que supone; pone de manifiesto la inquietud de los progenitores. Hay que sumar a esta situación el diagnóstico novedoso de disomía paterna no descrito anteriormente, que a los propios especialistas sanitarios no permite documentarse, lo cual genera más inquietud. Y mientras tanto, no sería de extrañar esperar que los progenitores acudan a uno y a otro especialista intentado tener el diagnóstico más certero de una situación tan novedosa como es una isodisomía paterna completa.

### 5.3.5 Gen *RMRP*: hipoplasia de pelo-cartílago.

#### 5.3.5.1. Resultados para el gen *RMRP*

Se realizó el estudio en 2 pacientes con diagnóstico clínico y en sus familiares directos:

- ACH-128: varón de origen español que presentaba una doble mutación en heterocigosis: g.236A>G paterno y g.258G>A materno,
- ACH-358: varón de origen rumano que presentaba una doble mutación en heterocigosis: g.25\_-11dupACTACTCTGTGAAGC y g.96\_97dupTG materno.

Tres de las 4 mutaciones encontradas en estos dos casos han sido descritas previamente en varios pacientes con fenotipo de hipoplasia de pelo-cartílago (Thiel, 2007):

- La mutación c.236A>G en pacientes de origen estadounidense,
- La mutación c.96\_97dupTG en pacientes de origen canadiense y turco,
- La mutación g.-25-11dupACTACTCTGTGAAGC del paciente rumano; se describió por primera vez en un paciente español (Muñoz-Robles, 2006) y más tarde en pacientes de origen estadounidense .

Las 2 primeras mutaciones descritas provocan la alteración en la secuencia del gen, ambas incluidas en la región con predominio de participación en la función ribosomal de la ribonucleoproteínas. La 3ª mutación es de las mutaciones que aumentan la distancia entre la caja TATA y el inicio de la transcripción dando lugar a un transcrito disminuído. Las 3 mutaciones se consideran que presentan patogeneidad moderada.

La 2ª mutación no descrita del paciente afecto del caso ACH-128, c.258G>A también se encuentra en la región con función ribosomal, en la región donde Thiel y col. observan que están los fenotipos de hipoplasia de pelo-cartílago con

más severidad en la manifestación de la displasia esquelética e incluso donde se ubican mutaciones para la displasia anauxética, por lo que habría que considerarla como una mutación grave.

En los pacientes afectados de este desorden es recomendable el estudio de la función inmunológica tanto humoral (déficit de IgG) como celular (linfopenia) y valorar la existencia de datos de anemia macrocítica no regenerativa. Además, estos pacientes asocian un mayor riesgo de neoplasias, principalmente de origen hematológico (linfomas y leucemia) (Taskinen, 2008; Rider, 2009). Las opciones terapéuticas contemplan las osteotomías para corregir deformidades de las extremidades y de la columna vertebral, el alargamiento óseo en la infancia tardía o adolescencia, el tratamiento de las infecciones con profilaxis de las mismas si existe inmunodeficiencia, y el tratamiento de la anemia si aparece. La supervivencia de estos pacientes está ligada, por un lado, a la displasia esquelética que presenten, teniendo mayor mortalidad los casos más severos y, por otro lado, por la presencia de inmunodeficiencias severas o procesos neoplásicos.

El diagnóstico diferencial de esta enfermedad debe hacerse con la displasia cifomélica (MIM 211350), la displasia inmunósea tipo Schimke (MIM 242900), el síndrome de Omenn (MIM 603554), la displasia esquelética con inmunodeficiencia combinada severa (MIM 200900) y el síndrome de Shwachman-Diamond (MIM 260400). Sin embargo, la talla baja desproporcionada con hipoplasia del pelo de estos pacientes orienta hacia una condrodisplasia metafisaria tipo McKusick. (**tabla 5.3**; Fenollar-Cortés, 2015).

#### **5.3.5.2. Sensibilidad de la metodología utilizada para el gen *RMRP***

Sólo se han descrito mutaciones en el gen *RMRP* que causen hipoplasia de pelo-cartílago y se han encontrado en el 100% de los pacientes afectados sin encontrarse mutaciones debidas a grandes deleciones/duplicaciones del gen (GeneReviews Cartilage-Hair Hypoplasia). La metodología utilizada en esta tesis cubre el gen completamente así como ampliamente las regiones 5' y 3' por lo que se cubren todas las mutaciones descritas a fecha de hoy (Thiel, 2007; HGMD®), alcanzando una sensibilidad del 100%.

#### **5.3.5.3. Asesoramiento genético**

El primer caso ACH-128 vino para asesoramiento genético reproductivo. Una vez caracterizadas las 2 mutaciones en el afecto y el estado de portadores en los progenitores, se explicó el tipo de herencia autosómica recesiva, la probabilidad de descendencia afectada en un 25% de los casos y las opciones reproductivas para futuras gestaciones.



**Tabla 5.3. Características de las entidades clínicas que presentan diagnóstico diferencial con la hipoplasia de pelo-cartilago**

	Hipoplasia de pelo cartilago	Displasia cifomélica	Displasia inmunósea tipo Schimke	Síndrome de Omenn	Displasia esquelética con inmunodeficiencia combinada severa	Síndrome de Shwachman-Diamond
<b>MIM</b>	250250	211350	242900	603554	200900	260400
<b>Gen</b>	<i>RMRP</i>	Desconocido	<i>SMARCA1</i>	<i>DCLRE1C, RAG1, RAG2</i>	Desconocido	<i>SBDS</i>
<b>Localización</b>	9p13	Desconocido	2q35	11p12, 10'13	Desconocido	7q11
<b>Herencia</b>	AR	AR	AR	AR	AR	AR
<b>Alt Esq Tipo</b>	<b>POS</b> metafisaria	<b>POS</b> metafisaria	<b>POS</b> espondiloepifisaria	NEG	<b>POS</b> Metafisaria	<b>POS</b> Metafisaria
<b>Fémur y tibia incurvados</b>	<b>POS</b>	<b>POS</b>	NEG	NEG	NEG	NEG
<b>Talla baja</b>	<b>POS</b> Desproporcionada	<b>POS</b> Desproporcionada	<b>POS</b> Desproporcionada	NEG Fracaso del desarrollo	<b>POS</b> Desproporcionada	<b>POS</b>
<b>Alt Hemato Tipo</b>	<b>POS</b> Linfopenia, neutropenia, riesgo malignidad	NEG	<b>POS</b> Linfopenia, neutropenia, trombocitopenia	<b>POS</b> Eosinofilia, trombocitopenia	<b>POS</b> Linfopenia	<b>POS</b> Pancitopenia, riesgo malignidad
<b>Anemia</b>	<b>FRECUENTE</b>	NEG	<b>POS</b>	<b>POS</b>	NEG	<b>POS</b>
<b>Pelo</b>	<b>Ralo, cejas y pestañas escasas y rubias</b>	Normal	<b>Fino</b>	<b>Alopecia</b>	Normal	Normal
<b>Alt Inmuno Tipo</b>	<b>POS</b> ↓ Cél T y B	NEG	<b>POS</b> ↓ Cél T	<b>POS</b> Linfoadenopatía, nódulos linfáticos desestructurados, ↓ Cél B	<b>POS</b> Agammaglobulinemia, hipoplasia de timo	NEG
<b>Alt Gastro Tipo</b>	<b>POS</b> Malabsorción intestinal, enf de Hirschprung, atresia esofágica	NEG	NEG	NEG	NEG	<b>POS</b> Insuficiencia pancreática exocrina
<b>Alt renal Tipo</b>	NEG	NEG	<b>POS</b> Nefropatía progresiva, rápida y fatal	NEG	NEG	NEG
<b>Retraso mental</b>	NEG	NEG	NEG pero descrito	NEG	DESCONOCIDO	<b>POS</b>
<b>Esperanza de vida</b>	Adulto	Adulto	Infancia	Infancia	Lactante	Adulto

Dentro de estas opciones reproductivas se encuentran:

- Las técnicas de reproducción asistida:
  - Donación de gametos sexuales, de cualquier progenitor.
  - Diagnóstico genético preimplantatorio: para la selección de embriones. Ésta fue la primera opción de la pareja pero en ese año, 2007, esta técnica en su Comunidad Autónoma estaba recién implantada y presentaba una lista de espera extensa. Tras un año de espera, optaron por otra opción reproductiva.
- Diagnóstico prenatal en un embarazo en curso: la 2ª opción reproductiva que escogieron.
  - No invasivo: que se realizó en las dos siguientes gestaciones como se explica en el apartado 5.2.2.1.
  - Invasivo: que se realizó mediante amniocentesis en el 1º embarazo y mediante biopsia de corion en el 2º embarazo. El proceso y los resultados obtenidos se explican en el apartado 5.2.2.1.

Y también se plantea en el asesoramiento reproductivo la asunción de una descendencia afecta y la adopción.

En el caso del *probandus* toda su descendencia, independientemente del sexo, será portadora de una mutación por lo que es conveniente el estudio del gen *RMRP* de su futura pareja para conocer su estatus genético ya que, si es a su vez también es portadora, el riesgo de descendencia afecta es del 50% en vez del 25%. Dada la edad del paciente se indica que hay posibilidad de descendencia libre de enfermedad y se recomienda que acuda a una consulta de Genética Clínica ante deseo de descendencia para recibir información actualizada.

En el caso ACH-358, el estudio venía para confirmación clínica ya que tenía un diagnóstico previo, realizado al mes de vida, de afecto de ACH. Suponemos que será precisamente porque se hizo el diagnóstico a tan corta edad la que llevó al error diagnóstico porque existen claras diferencias en el fenotipo de uno y otro: principalmente la dismorfia facial clara de la ACH frente a la ausencia de la misma en la hipoplasia de pelo-cartílago pero que sí presenta ese pelo hipoplásico característico.

El asesoramiento reproductivo para la madre de este *probandus* es la recomendación del estudio de la nueva pareja para conocer si es portador o no de una mutación previa a un nuevo embarazo.

### **5.3.6. Gen *SHOX*: discondreosteosis de Léri-Weill, displasia mesomélica de Langer y talla baja idiopática**

#### **5.3.6.1. Resultados genéticos positivos del gen *SHOX***

El número de alteraciones descritas asciende a 15 casos de las cuales 11 son deleciones, suponiendo el 73,3% de los casos, 3 son duplicaciones (21,4%) y 1 es una mutación puntual (7,2%). El dato de que las duplicaciones constituyen la mutaciones más frecuente en las alteraciones en el gen *SHOX*, coincide con la bibliografía (Capone, 2010). Sin embargo, no lo es que las duplicaciones sean superiores a las mutaciones puntuales. Esta diferencia puede ser debido a que sólo un porcentaje pequeño de pacientes de estas series han sido secuenciados, debido a la heterogeneidad en la selección.

##### **5.3.6.1.1. Deleciones en el gen *SHOX***

La mutación más repetida en nuestra serie es la deleción heterocigota de la región 3' del gen *SHOX*, descrita en pacientes afectados de TBI y de DLW y propuesta como región reguladora, cuyas mutaciones disminuyen la transcripción del gen y por tanto la aparición de la haploinsuficiencia de la proteína (Benito-Sanz, 2012).

La delimitación de esta región reguladora putativa del gen *SHOX* se realizó en varias etapas. Primero se describió una región común mínima en una serie de 12 pacientes afectados de DLW en donde se describía por primera vez la presencia de una delección heterocigota en la región 3' del gen *SHOX* sin implicar al propio gen, en estos pacientes afectados de DLW (Benito-Sanz, 2005). Fukami describió una región de 800pb incluida dentro de esta región mínima, y demostró que esta región presentaba actividad potenciadora del promotor del gen *SHOX* y se localizaba en el exón 2 (Fukami, 2006). Ese mismo año se describe esta delección como la más frecuente con un 38% de los casos en una cohorte de 26 pacientes afectados de DLW (Benito-Sanz, 2006). Entre el gen *SHOX* y esta región mínima hay 8 secuencias no codificantes evolutivamente conservadas, 3 de las cuales se han propuesto como reguladores potenciadores del gen *SHOX*. Uno de ellos se encuentra dentro de esta región frecuentemente delecionada, justo entre la sonda 6291-L0622 y la sonda 6293-L06219 de la SALSA P018-D1 (Chen, 2009) (**figura 4.29; pág. 128**). Se han descrito varios pacientes con deleciones de estos elementos y afectación tanto de DLW como de TBI (Chen, 2009; Barroso, 2010).

Por último se describieron 30 pacientes afectados de DLW o TBI que presentaban delección de las sondas 5645-L05099, 5646-L05100 y 5647-L05101 ubicadas en la región reguladora putativa (Benito-Sanz, 2012), las dos primeras son las sondas delecionadas en nuestros 6 pacientes. En esta región delecionada se describió 8 regiones cis-reguladoras evolutivamente conservadas, una de las cuales demostraron que interactuaba con el promotor del gen *SHOX* (Benito-Sanz, 2012).

Por lo tanto, parece demostrado que esta región juega un papel importante en la regulación del gen *SHOX* potenciando su transcripción. Las mutaciones en esta región dan lugar a fenotipos tanto de DLW como de TBI. En nuestra serie de pacientes, aparece sólo en afectados de TBI con una frecuencia del 40% (6 sobre 15).

También en la región 5' están descritos 3 elementos no codificantes altamente conservados. Estudios en modelos animales demostraron que se encuentran activos como regiones potenciadores de expresión en el desarrollo germinal de las extremidades del pollo (Durand, 2010). Al estar muy conservadas, se supone que también juegan un papel importante en la regulación del gen *SHOX* en el humano. En nuestra serie existen dos pacientes que presentan una delección heterocigota en la que se encuentra implicada esta región. En ambos casos la delección tiene la misma longitud y se prolonga hasta el exón 6A. La expresión clínica de estos dos casos era de DLW.

La delección de un único exón es una alteración rara. Fukami describe mutaciones intragénicas crípticas en 3 mujeres afectas de DLW (Fukami, 2008). En la base de datos HGMD también se encuentra descrita la delección exclusiva de un

exón, en este caso el exón 2 en un paciente afecto de TBI. Ninguna es como la presentada por nuestra paciente afecta de DLW con una delección heterocigota del exón 3.

#### **5.3.6.1.1. Duplicaciones en el gen *SHOX***

De las 3 duplicaciones encontradas, 2 incluyen al gen *SHOX* y ambas de forma completa y la última se encuentra en el PAR1 alejada de la región reguladora:

- ACH-81 presenta una duplicación desde la región 5', todo el gen *SHOX* y parte de la región 3' en una mujer adulta con talla baja desproporcionada sin deformidad de Madelung descrita en la clínica de la paciente, aunque no constaba estudio de imágenes realizadas en antebrazo. Tras este resultado en el gen *SHOX* fue diagnosticada de afecta de DLW.
- Varios-517: se encontró en una niña en estudio por presentar retraso psicomotor que, en el análisis de las regiones subteloméricas de todos los brazos largos y cortos de los cromosomas, se encontró una duplicación de todo el gen *SHOX* y parte de la región 3' heredada del padre, del cual se desconoce la clínica.
- HCSC-18 presentó una duplicación en una región alejada y fuera de la propuesta como región putativa reguladora del *SHOX* con una clínica inicial de TBI y sobrepeso que, actualmente, con 16 años, presenta una talla baja (159,4 cm; -2,85SDS), una disarmonía evidente por acortamiento de miembros inferiores y un IMC superior al P50. Esta duplicación es heredada de su padre que presenta una talla final de -3,01SDS.

La primera duplicación del gen *SHOX* se publicó en el año 2001 en una señora ya en la senectud que presentaba deformidad de Madelung sin talla baja (Griglioniene, 2001). Esa misma duplicación la presentaba una hermana de la *probandus* sin clínica ni de deformidad de Madelung ni talla baja patológica. La siguiente publicación realizada por ese mismo grupo es de 8 años más tarde, donde presentan la anterior familia junto a 3 más (Thomas, 2009). Todas las duplicaciones encontradas incluyen el gen *SHOX*, no en todas las familias cosegrega y además la indicación de estudio en dos de ellas no es por talla baja ni deformidad: una es por clínica de Asperger en el *probandus* y aparece tras estudio de los subtelómeros de los brazos largos y cortos de todos los cromosomas, y la segunda es por una paladar ojival familiar. Todas son heredadas de un progenitor. La conclusión de este artículo fue que el efecto de la duplicación depende del tamaño, la posición y el número de elementos no codificantes altamente conservados implicados (Thomas, 2009). Nuestro segundo caso (Varios-517) sería similar al caso de clínica de Asperger: es un hallazgo casual cuando analizas otras regiones cromosómicas y no explica la clínica que presenta la *probandus*.

La serie más larga publicada en la realizada por Benito-Sanz y col en 15 pacientes afectos de DLW (9 casos) y de TBI (6 casos) de las cuales 14 implicaban al menos el gen *SHOX* y una sólo presentaba duplicación de la región 5' del PAR1. La conclusión a la que llega este grupo es que las duplicaciones parciales del gen *SHOX* parecen ser más deletéreas que las duplicaciones completas (Benito-Sanz, 2011). En nuestro caso no tenemos ninguna deleción parcial, son completas del gen *SHOX*.

Fukami y col encuentran una duplicación en 4 pacientes afectos de TBI y 1 control poblacional. Tres de los 4 pacientes afectos presentaban una duplicación que implicaba al gen *SHOX*. Un paciente y el control presentaban una duplicación de la región 3' del PAR1, que implicaba a la región reguladora. Este grupo concluye que las microduplicaciones que contienen al gen *SHOX* causan TBI por disrupción de la maquinaria cis-reguladora del gen *SHOX* y que los elementos ALU frecuentes en esta región son los responsables de parte de estas microduplicaciones (Fukami, 2015). En nuestra serie, tenemos 2 pacientes que presentan una duplicación que contienen el gen *SHOX*:

- ACH-81: y por lo tanto, su duplicación afectaría a la maquinaria cis-reguladora que provoca su afectación de DLW
- Varios-517: no parece que la duplicación encontrada en esta *probandus* y su padre tenga implicaciones por lo que habría que suponer que no afectaría a esta maquinaria cis-reguladora pero no tenemos cómo comprobarlo.

#### 5.3.6.1.2. Mutaciones puntuales en el gen *SHOX*

La mutación en homocigosis p.Ala170Pro detectada en el caso ACH-307 está descrita en población gitana española, como la procedencia étnica de nuestra paciente, y se describe ampliamente más adelante, en el epígrafe 5.3.6.7.

#### 5.3.6.2. Presentación clínica de los pacientes positivos para el gen *SHOX*

Ante la presencia de una alteración en el gen *SHOX*, un paciente es diagnosticado de afecto de DLW cuando, al menos, presenta talla baja disarmónica o deformidad de Madelung o ambas. En la serie presentada de 5 pacientes con afectación de DLW, todos cumplen alguna de estas características.

No ocurre así con los afectos de TBI. Por la tabla 4.11 podemos observar que la única característica física compartida por 3/4 de los casos es una talla baja <2SDS. La presencia de un familiar también con talla inferior a <2SDS es un criterio con mayor frecuencia que la propia talla baja en el *probandus* (83%).

Un 25% de los casos presentó en el periodo prenatal un CIR. Los CIR están englobados dentro de los desórdenes primarios de talla baja y su presencia ya

excluye la posibilidad de ser una talla baja idiopática. De hecho, hay autores que recomiendan el estudio del gen *SHOX* en pacientes con TBI sin CIR (Kant, 2003). Este resultado obliga a plantearse la posibilidad del estudio del gen *SHOX* en pacientes con TB y CIR no recuperador. Nuevos estudios en pacientes con estas características nos indicarán si es un criterio a tener en cuenta.

El número de mujeres afectas en nuestra serie es el doble que de hombres, situación que también se encuentra en la bibliografía (Rappold, 2007; Binder, 2011; Wolters, 2013). Este sesgo se podría explicar por los estrógenos que inducen la maduración del hueso en ambos sexos. En la mujer se produce la liberación de estrógenos por los ovarios, situación que aumenta la concentración y aparición de estrógenos antes que en los hombres por lo que promueven el cierre prematuro epifiseal en mujeres afectas antes que en los varones afectados, apareciendo los signos de forma más precoz y severa. Esto explicaría por qué la deformidad de Madelung severa en niñas afectas de síndrome de Turner es rara ya que su función ovárica es casi nula (Seki, 2014). De hecho, el seguimiento a lo largo de la vida de una mujer con haploinsuficiencia de *SHOX* y con una función ovárica normal, presentó una maduración ósea apropiada antes de la pubertad y una maduración precoz durante la pubertad (Fukami, 2003). Por tanto, es una hipótesis plausible que la presencia de los estrógenos en la mujer adulta agrava el cuadro fenotípico que va a padecer debido a la haploinsuficiencia del *SHOX* lo que no hace extrañar que el número de mujeres afectas con signos sea mayor que en hombres.

Sin embargo, esta situación de los estrógenos no explica del todo el sesgo existentes de mujeres más afectas que varones, porque en pacientes que presentan TBI, donde no hay signos *a priori* de deformidad de Madelung también hay más afectación de mujeres que hombres. Y en muchos casos se trata de pacientes prepúberes, con niveles de estrógenos similares en ambos sexos (Wolters, 2013). La propuesta de este grupo es que esta diferencia es debido a que la delección del gen *SHOX* en el cromosoma X es más frecuente que la delección del gen *SHOX* en el cromosoma Y (Wolters, 2013).

#### **5.3.6.3. Grupo FGFR3**

Pocos datos clínicos tenemos de los casos positivos que nos permitan comparar con otras series:

- ACH-13: la clínica presentada por este caso no es concordante con la presencia de una delección única del gen *SHOX*. Ante la posibilidad de una doble mutación heterocigota de una posible displasia mesomélica de Langer, se secuenció el gen *SHOX* con resultado normal. Quedaría para finalizar el estudio, el análisis de MLPA pero éste no pudo realizarse porque la extracción de ADN realizada en su momento, presen-

taba una concentración de sales demasiado alta para realizar la técnica de MLPA de forma fiable (ver más adelante en este mismo apartado).

- ACH-28, ACH-81 y ACH-112: sólo se tiene constancia de la talla de uno de ellos en el momento de la consulta: ACH-112 que correspondía a -3,82SDS. Por la indicación clínica del facultativo responsable, podemos presuponer que presentaban una talla patológica y disarmónica, ya que la solicitud era de hipocondroplasia. La disarmonía es uno de los pilares de las alteraciones en el gen *SHOX* (Rappold, 2002; Wolters, 2013), sin embargo, ésta es sutil en las TBI y franca en la discondrosteosis de Léri-Weill. En principio ninguno de los tres casos presentaba una deformidad de Madelung, aunque esto puede ser debido a la corta edad de 2 de los 3 pacientes (4 semanas de vida y 12 años) lo que indicaría seguimiento para ver y tratar su aparición.

Los 5 microsatélites utilizados para el cribado, junto a la ampliación con el DXY6796 para cofirmar/descartar el resultado del DXYS10096, nos parece un método de cribado fácil y barato muy recomendable para laboratorios que no tengan otras opciones diagnósticas. Todos los pacientes afectos de esta serie hubiesen sido captados. La posibilidad de analizar a los progenitores aumenta aún más la sensibilidad pasando incluso a ser un método directo. Sin embargo, la técnica de MLPA debe ser la primera elección en el cribado de alteraciones del gen *SHOX*. Un estudio completo además incluiría la secuenciación del gen.

Entre los casos negativos, hay 9 casos en los que sólo se realizó STRs no pudiéndose aplicar la técnica de MLPA. Esta situación disminuye la sensibilidad en la detección porque, si bien en su diseño se eligieron marcadores ubicados próximos a las alteraciones publicadas y que cubriesen la región 5' (1 marcador), el gen *SHOX* (1 marcador), y la región 3' (3 marcadores), no cubren de forma sistemática toda la región, sobre toda la amplia región 3'.

El caso ACH-4 presentó hemi/homocigosidad en los 5 microsatélites utilizados, con un MLPA P018 que resultó normal (**figura 4.31; pág. 132**). El estudio de cromosomas sexuales indicó la presencia del gen *SRY* y de 2 cromosomas sexuales distintos, lo que descarta aneuploidías de los cromosomas sexuales *a priori*. Con estos datos resulta difícil interpretar un diagnóstico probable. Es el único caso en la base de datos de esta tesis en el que se presenta homocigosidad de todos los marcadores y no conlleva una delección del gen *SHOX*, si la interpretación del MLPA P018 es correcta. Ante un resultado de varón con dos cromosomas sexuales, una posibilidad sería la de una disomía parcial de la región PAR1, ya que al ser un varón los cromosomas sexuales son distintos.

Las disomías totales sexuales (XYY, XXY) están ampliamente descritas y conocidas. Las disomías parciales sexuales están menos descritas y son producto de translocaciones entre los brazos cortos/largos de los cromosomas sexuales. De la implicación del brazo corto, este tipo de translocación es poco frecuente y da



lugar a varones 46,XX en donde la parte terminal del brazo corto de un cromosoma X proviene del cromosoma Y y presenta *SRY+* (varón XX *SRY+*) o a mujeres 46,XY con reversión sexual al estar implicado el gen *DSS* localizado en Xp21. Otro evento posible es la translocación del brazo Xp a un autosoma, dando lugar a una disomía funcional del cromosoma X que se expresa en fenotipos de mujer, si contienen el gen *DSS*, o de varón, si no lo contiene, con retraso mental y dismorfia facial y en un 25% de los casos, con malformaciones en el sistema central nervioso (Sanlaville, 2004; Ghosh, 2008).

No cabe la posibilidad ni de una disomía sexual tipo XYY o XXY ni de un derivado de una translocación como las explicadas ya que estos patrones en el análisis con el kit comercial PALEX pueden diferenciarse al existir varios marcadores en Xp/Yp. Además no consta que el paciente presentase retraso mental.

Una remota posibilidad sería una disomía parcial sólo del gen *SHOX* y la región PAR1 adyacente a partir de la misma cromátida. Sin embargo, la presencia de un hermano fallecido con igual clínica no apoya ninguno de estos diagnósticos que no tienen un resultado fatal. Hace sospechar más de una displasia ósea recesiva y que, ante consanguinidad en los progenitores, la región PAR1 presentase homocigosidad.

#### **5.3.6.3.1. Justificación del estudio del gen *SHOX* en el grupo *FGFR3***

Uno de los genes que regula el gen *SHOX* es el gen *FGFR3*. El gen *FGFR3* es un regulador negativo del crecimiento longitudinal de los huesos largos y el gen *SHOX* es un regulador positivo de este crecimiento longitudinal mucho más activo en los segmentos mesomélicos que rizomélicos (Rappold, 2012). Así un individuo con alteraciones en el gen *SHOX* provoca el aumento de expresión del gen *FGFR3* por lo que se acelera el cierre prematuro de las placas de crecimiento de la tibia y el peroné provocando el acortamiento de estos huesos. El efecto en los segmentos rizomélicos es mucho menos visible al regular menos el gen *SHOX* esta región. Así mismo, las mutaciones en el gen *FGFR3*, que provocan una ganancia de función en la proteína, tienen mayor efecto en los segmentos rizomélicos que en los mesomélicos precisamente por estar menos regulados por el gen *SHOX* (Decker, 2011). De esta forma se explican los dos fenotipos por mutaciones en estos genes: talla baja rizomélica en la acondroplasia y talla baja mesomélica en la discondrosteosis de Léri-Weill.

Existen disitintos diagramas de flujo propuestos para el estudio molecular de la talla baja. Todos coinciden en que, ante la presencia de signos clínicos que indiquen una patología concreta, se debe empezar por el estudio de esos genes. Es decir, pacientes con talla baja desproporcionada mesomélica y deformidad de Madelung, se debe iniciar el estudio con el gen *SHOX* así como pacientes con talla baja desproporcionada rizomélica y signos clínicos de acondroplasia/hipocondroplasia comenzar con el estudio de *FGFR3*.

Sin embargo, el reto proviene en el diagnóstico de pacientes con talla baja y ausencia o mínimos cambios radiológicos con un cariotipo normal. Para estos casos, existen distintas propuestas, todas con estudio del gen *SHOX* y en menor proporción el gen *FGFR3*:

- en la propuesta de Kant (2003), propone el estudio de ambos genes en dos supuestos:
  - Pacientes con desproporción evidente: recomienda el estudio de estos dos genes.
  - Pacientes sin desproporción y sin crecimiento intrauterino retardado: recomienda el estudio del gen *SHOX* seguido de *GHI*, *HGR* y, por último, *FGFR3*.
- En la propuesta de Seaver (2009) se propone el estudio de gen *SHOX* en tallas bajas idiopáticas aisladas con sutiles cambios radiológicos consistentes en mesomelia o deformidad de Madelung. En los casos en los que no se ve ningún cambio, proponen seguimiento clínico y nueva radiología a edad más tardía.
- En la propuesta de Wit (2011), que es una adaptación de la anterior, se propone el estudio de los genes *SHOX* y *FGFR3* en el caso de la talla baja aislada desproporcionada con un estudio radiológico normal.
- En la propuesta de Dauber (2014) proponen el estudio del gen *SHOX*, tras un cariotipo normal si es mujer, en pacientes que presenten una talla baja desproporcionada con estudio radiológico normal. El estudio del gen *FGFR3* queda a considerar sin una indicación clara.

En resumen, parece justificado el estudio del gen *SHOX* en individuos que presenten desproporción y talla baja. Si no presentan desproporción, no está clara el beneficio del estudio del gen *FGFR3*, dadas las pocas posibilidades de encontrar una mutación frente a la inversión en tiempo, recursos y costes económicos.

Nuestros datos avalan estas propuestas: los pacientes del grupo *FGFR3* presentan desproporción y talla baja. En estos pacientes encontramos mutación en el gen *SHOX* en un 10-13,3% de los casos. Sin embargo, no todas las publicaciones presentan este resultado: los estudios de secuenciación del gen *SHOX* y estudio de 2 marcadores STRs intragénicos para ver deleciones del gen, realizados por Grigeliuniene en 18 pacientes con HCH y resultado negativo en el gen *FGFR3*, fueron todos negativos (Grigeliuniene, 2000). La metodología utilizada es la inversa a la nuestra: secuencian primero y estudian deleciones con STRs como segunda opción diagnóstica. Aún teniendo en cuenta que los resultados son negativos, existe una inconveniencia importante en este estudio: las deleciones/duplicaciones son más frecuentes que las mutaciones puntuales en el

gen *SHOX* (Capone, 2014) y estas alteraciones se pueden encontrar a lo largo de todo el PAR1. Si bien es verdad que 3 de nuestros 4 resultados positivos, excepto la familia ACH-13, hubiesen dado un resultado positivo en esta publicación ya que sería esperable que los 2 marcadores STRs intragénicos utilizados en esta publicación fuesen hemicigotos.

#### 5.3.6.4. Grupo IE

La tasa de detección encontrada en este grupo fue de 1,79%, algo menor que los valores publicados en la literatura (Rao, 1997; Binder, 2003; Chen, 2009, Albuissou, 2012). El caso positivo, ACH-338, era un varón de 2 años que presentaba una talla en el rango de la normalidad bajo sin otra clínica. Esta delección era heredada del padre que sí presentaba una TBI con una altura final de -2,3SDS. No consta que presentase deformidad de Madelung, como tampoco parecía presentarla el *probandus* tras la radiografía realizada a los 3 años aunque no es frecuente observar esta deformidad a esa edad y menos siendo un varón.

De nuevo es la selección de los pacientes la que define la sensibilidad de la prueba. En este caso eran pacientes todos ellos con una talla normal-baja o baja armónica. En algunos de ellos indicado en la propia descripción. Estos pacientes, además de ser valorados por su pediatra, son reevaluados en la consulta de genética clínica. Se ha sobreesupuesto que, aquellos casos en los que no se indicaba explícitamente en una u otras historia clínica una disarmonía, es porque se consideraron fenotípicamente armónicos. Algunos de ellos tenían la solicitud de estudio del gen *SHOX* en la primera consulta de pediatría, junto al cariotipo, y sin un seguimiento en la evolución de la talla.

Del análisis de los casos negativos podemos observar que el RCCD fue la sospecha diagnóstica en el 61,8%. El RCCD se define como aquellos cuadros clínicos de talla baja en el infante en los que existe un componente familiar de RCCD, pero que alcanzaron una talla adulta normal. El RCCD puede manifestarse de una forma intensa ya durante el desarrollo prepuberal con un cuadro de TB asociado a gran retraso de la maduración ósea (en general entre 2-3 años con respecto a la edad cronológica) y normalidad de todas las funciones endocrinológicas. Sin embargo, es difícil su diagnóstico ya que hasta que no comienza la pubertad y no se alcanza la edad adulta no se puede confirmar. En ese momento, si ha resultado que no es un RCCD, no se puede intervenir sobre la talla final del individuo (Carrascosa, 2011).

El consenso alcanzado por endocrinos pediatras de *Growth Hormone Research Society*, *Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society* y *European Society for Pediatric Endocrinology* sobre TBI incluyó los RCCD como una más de las entidades clínicas que forman parte del TBI (Cohen, 2008). Sin embargo, esta consideración no es compartida por todos los endocrinos pediátricos: el grupo español de consenso de TB propone excluir esta alteración de la TBI ya que aunque es cier-

to que no se conoce su etiología, la talla adulta que alcanzan la mayoría de estos individuos de forma espontánea es normal, por lo que dejarán de estar dentro del grupo de tallas bajas (Carrascosa, 2011). El seguimiento que reciben estos pacientes, basado sobre todo en la observación clínica, es muy diferente al de resto de individuos dentro de las TBI que además en la edad adulta no tendrán una talla normal.

Como se ha podido observar en la introducción, esta tesis se acoge a este criterio de exclusión de modo que, como primer requisito de la TBI, se ha de tener una talla baja por debajo de -2 SDS con expectativas de alcanzar también una talla baja patológica en la edad adulta, es decir, las RCCD están excluidas (Carrascosa, 2011).

En nuestra series del grupo IE, 11 casos presentaban talla baja familiar de los cuales 5 además presentaban RCCD. La talla baja familiar (TBF) es la que presenta un infante que al nacer presentaba peso y longitud normal, talla en el momento de estudio por debajo de -2SDS corregida, antecedentes familiares de talla baja, fenotipo armónico, velocidad de crecimiento normal, pubertad normal, talla final baja y ausencia de enfermedad orgánica, endocrina, nutricional o carencia afectiva (Pombo, 2011).

En la **tabla 5.4** se describen las características de estas dos entidades (Ismail, 2013).

**Tabla 5.4: Características de la talla baja familiar y del retraso del crecimiento constitucional y del desarrollo**

	TALLA BAJA FAMILIAR	RCCD
<b>Altura progenitores</b>	Uno o ambos bajos	En rango
<b>Inicio puebertad en progenitores</b>	normal	retrasado
<b>Velocidad de crecimiento</b>	normal	Desaceleración o normal
<b>Inicio de la pubertad</b>	normal	retrasada
<b>Edad ósea</b>	normal	Retrasada (2 a 3 años)
<b>Altura final en adulto</b>	baja	normal

Por tanto, los 34 casos de RCCD y los 6 de TBF constituyen el 72,7% de los casos remitidos para estudio de talla baja. Estos resultados son acordes a los encontrados en la bibliografía: en el estudio de Utah, las TBF y el RCCD en conjunto suponían el 75% de los casos (Lindsay, 1994). La TBF, el RCCD y las deficiencias de la hormona de crecimiento son las causas mas frecuentes de una talla baja (Yadav, 2015). En nuestra serie, sólo 1 caso presentaba déficit de hormona de crecimiento, ACH-337 (1,79%). Es de suponer que este bajo porcentaje es porque la mayoría de casos que presentasen este déficit, eran detectados antes de ser enviados a la consulta de genética clínica.

Entre los 17 casos restantes con resultado negativo y que no presentan TBF, ni RCCD ni déficit de hormona de crecimiento, existen 4 casos con diagnóstico

final de TBI al no encontrarse ninguna justificación para su talla baja con una talla genética no patológica. Es sobre esta población en la que habría que hacer el estudio del gen *SHOX*.

Si aplicamos los criterios que definen un paciente con TBI, es decir, una talla menor de -2SDS, que no hayan presentado CIR y sin alteraciones orgánicas y demás enfermedades descartadas por otros estudios (Carrascosa, 2011), tenemos que de los 56 casos iniciales, sólo 28 serían candidatos para el estudio del gen *SHOX* como responsable de esa TBI (50% de los casos iniciales). Entre ellos no estaría el caso positivo ACH-338.

La edad de inicio de los estudios es también otra variable a tener en cuenta. En general se consideran los 3 años el límite inferior para permitir una recuperación del crecimiento sin intervención, y no debe estudiarse a menos que presente una talla baja patológica sin crecimiento. En nuestra serie hay 7 casos con una edad inferior a 3 años (12,5% de los 56 iniciales), incluido el caso positivo.

Por tanto podemos concluir que el estudio de pacientes con una talla normal-baja o baja armónica de forma generalizada sin un evolutivo presenta la tasa de detección de alteraciones en el gen *SHOX* más baja (1,79%). La selección de los pacientes parece necesaria para optimizar recursos y expectativas en el facultativo y los progenitores.

#### **5.3.6.5. Grupo RAPPOLD**

Los 3 casos positivos constituyen el 9,7% de los casos y las 3 presentan la delección heterocigota en la región putativa en la que están descritas 8 regiones cis-reguladoras que interactúan con el promotor del gen *SHOX* (Benito-Sanz, 2012). Ninguno de los 3 casos comparte criterios en la escala de Rappold:

- ACH-138 presentaba IMC>50 e hipertrofia de pantorritas con una puntuación final de 7,
- ACH-261 presentaba un brazo/talla <96,5% e incurvación del antebrazo con una puntuación final de 5,
- ACH-339 presentaba una talla sentado/talla >55,5% con una puntuación final de 2.

Dada la pequeña serie, no podemos indicar unos criterios comunes.

En todos los casos, la alteración era heredada de un progenitor. En los casos ACH-138 y ACH-261 se pudo realizar un estudio familiar más extenso. En la familia ACH-261, la hipótesis II (**figura 4.36: pág. 141**) nos parece menos posible ya que, que se produzca el mismo evento de recombinación en dos cigotos separados en tiempo y espacio, lo hace menos probable. En la hipótesis III, que contempla la hipótesis I, se observa que la tía II:3 ha heredado una duplicación del alelo materno. Esto podría explicar la talla alta que presenta esta señora, al tener un

alelo con la delección pero otro con duplicación. Sin embargo aún están en estudio las implicaciones de las duplicaciones en el gen *SHOX*. Hasta la fecha sólo están publicados dos casos de duplicación que no implican el gen *SHOX*: en un paciente con TBI y en un control (Fukami, 2015). El estudio de MLPA no permitió dilucidar este resultado dada la concentración de ADN de inicio al partir de células bucales y a que el protocolo de extracción de estas muestras no incluye el paso de etanol. La muestra tras estos estudios se agotó.

Resulta llamativo que, de todos los individuos portadores de la mutación, sólo los 2 únicos varones con delección presentan una talla baja patológica: el padre de la familia ACH-138 (-2,57SDS) y el abuelo de la familia ACH-261 (-2,39SDS). Todas las mujeres con alteración presentaban una talla bajas pero en el rango de la normalidad, incluidas las *probandi* ACH-261 y la ACH-339. Este resultado vuelve a mostrar la variabilidad fenotípica de las alteraciones del *SHOX* y se contrapone a la observación de que afecta más a mujeres que a hombres y se pronuncia más con la edad (Albuisson, 2012). Sin embargo la serie es pequeña y debe ampliarse para confirmar estos resultados.

De nuevo el diagnóstico más frecuente es un probable RCCD con 13 casos que supone, sobre las 31 familias, un 41,8%. Junto a los 4 casos de TBF suponen el 54,8%. En esta serie hay 8 casos con diagnóstico final de TBI (25,8%).

#### **5.3.6.5.1. Valoración de la escala de Rappold**

A pesar de ser una muestra pequeña, definiendo un punto de corte  $<4$  se obtienen unos VPN y de especificidad altos. Este punto de corte permite hacer un cribado en pacientes con talla baja para su indicación de estudio del gen *SHOX* porque aquellos que no tengan una puntuación mayor de 4, no tienen indicación de estudio con un margen de error del 4%. Este cribado permite, por tanto, optimizar los recursos materiales y de tiempo en el laboratorio de genética molecular con el objetivo de reducir la presión asistencial y los costes derivados.

Sin embargo, es necesario una serie mayor que aumente los casos positivos para poder valorar la capacidad de detectar al individuo con posibilidades de ser afecto de talla baja por haploinsuficiencia del gen *SHOX*, es decir, que aumente la sensibilidad.

Si seleccionamos a los pacientes que tengan una talla al inicio del estudio un valor  $<2$ SDS (premisa inicial) y que se encuentren en edad prepuberal, el número de pacientes iniciales disminuye a 18. En esta serie, con un punto de corte  $<4$  tenemos a 12 pacientes excluidos de los 18 y con el punto de corte de  $<7$ , a 17 pacientes. De nuestros tres casos positivos, la familia ACH-339 no hubiese entrado en el estudio, la familia ACH-261 entraría en el punto de  $<4$  y de nuevo, la familia ACH-138 sería la única a estudio.

Efectivamente, la talla baja patológica se considera a partir de  $<2\text{SDS}$ , sin embargo, en la práctica clínica no siempre es fácil mantener este corte, por distintos motivos, que van desde el seguimiento evolutivo por parte del endocrino pediátrico que no observa una mejoría ante ausencia de otras alteraciones, hasta la propia ansiedad de los progenitores que pueden demandar estudios e intervenciones más directos. En nuestra serie algo menos de la mitad no presentaban esta talla patológica inicial.

Del mismo modo, la edad correcta para el comienzo del estudio de los niños es 3 años a menos que exista una talla baja patológica sin crecimiento. Y de nuevo en la práctica clínica este límite de edad es difícil de mantener, en este caso con un componente más de ansiedad de los progenitores.

Existen otras escalas propuestas para la valoración el estudio del gen *SHOX* en infantes con TBI:

- Binder y col: proponen medir la relación entre las extremidades (suma de la medida de la pierna y del brazo) con la medida del tronco. Es una forma de medir la desproporción de extremidades con el tronco, de medir micromelia. En la serie de este grupo, de 140 pacientes con TBI, 3 pacientes tenían alteración en el gen *SHOX* (2%) y en estos pacientes observaban una relación  $<1,95$  (Binder, 2003). También encontraron signos leves de displasia en la muñeca con la triangulación de la epífisis radial y la piramidalización de los huesos carpianos (Binder, 2003).

No podemos realizar estas medidas en nuestra serie porque no tenemos la longitud de las piernas, pero sí se mide la relación entre la braza y la talla que también mide micromelia. Este criterio es, además, el segundo más frecuentemente encontrado entre los pacientes de nuestra serie, incluida una de las pacientes afectas (ACH-261).

- Jorge y col: proponen medir la relación talla sentado/talla corregido por edad. En una serie de 63 individuos con TBI encuentra mutación puntual en el gen *SHOX*, ninguna delección, en 2 pacientes (3,2%). Al utilizar la relación propuesta  $>2\text{SDS}$  se aumenta la tasa de detección de mutaciones en *SHOX* en un 22% (Jorge, 2007).

En nuestra serie se mide la relación talla sentado/talla aunque no está corregida por edad y sólo aparece en un caso precisamente de un afecto (ACH-339).

Ninguna de las tres escalas, las 2 anteriores y la de Rappold, tiene un VPP alto por lo que estos sistemas tienen un valor limitado dada la alta variabilidad en la expresión del *SHOX* (Dauber, 2014). En nuestra serie queda demostrado este VPP bajo.



- Wolters y col: proponen que una disminución en la relación talla sentado/talla y una disminución en la relación extremidades/tronco, demostró ser el VPP y VPN, respectivamente, para identificar deficiencias en el gen *SHOX*. Estudiaron a 449 infantes con talla baja e identificaron 22 casos positivos (4,9%) con distintas alteraciones: 6 deleciones, 2 duplicaciones y 14 mutaciones. Esta propuesta se basa en comparar estos 22 casos con 44 infantes que no presentaban alteraciones en el gen *SHOX* pero que no diferían entre sí, en talla, peso, IMC o talla genética. También es frecuente encontrar que pacientes afectados de mutaciones en el gen *SHOX* presenten hipertrofia de pantorrillas y paladar hendido (Wolters, 2013).

#### 5.3.6.7. Grupo OTROS

Se obtuvieron 4 resultados positivos de 4 casos con muy diferente origen. En todos ellos había varios familiares afectados:

- ACH-109: varón de 72 años con deleción heterocigota del gen *SHOX* y que le diagnosticó de TBI. Presentaba como antecedente, y motivo por el cual se hizo el estudio, una nieta afecta de DLW. En esta familia se puede observar la variabilidad fenotípica presentada por las alteraciones en el gen *SHOX*.
- ACH-162: mujer de 29 años con deformidad de Madellung y deleción heterocigota del gen *SHOX* heredada de su padre. Presenta una hermana sin deformidad y sin alteración. En esta familia se puede observar la herencia pseudoautosómica: *a priori* las dos hermanas deberían haber recibido el cromosoma X idéntico y ser ambas afectas, sin embargo, en la **figura 4.41 (pág. 148)** se puede observar que no ha ocurrido así ya que la hermana no afecta ni tiene la deleción por la técnica de MLPA ni tiene el mismo haplotipo que la *probandus*. La abuela de la paciente presenta la deleción en el cromosoma X que heredaron sus dos hijos. La presencia de un primo paterno afecto ya supone el primer “salto” porque la alteración debió pasar del cromosoma X de la abuela al cromosoma Y de su hijo (padre del primo). La *probandus* heredó de su padre el cromosoma X con la alteración pero su hermana heredó el cromosoma X recombinado en su región PAR1 con el cromosoma Y y de esta forma se libera de la deleción.
- Varios-517: mujer de 6 años que acude por presentar retraso mental, alteraciones cerebrales y talla baja, que en el estudio para el diagnóstico de su retraso, se detecta una duplicación del gen *SHOX* heredada de su padre que no presenta ninguna clínica. Esta duplicación encontrada puede provocar la presencia de la talla baja pero no explica el resto de la clínica presentada por la paciente que se engloba dentro de los síndromes polimalformativos con retraso mental. Se le realizó estudio mediante

array-CGH 180K con resultado normal, exceptuando la duplicación ya descrita, por lo que no se pudo filiar la etiología de su patología.

Benito-Sanz describen otra paciente que presentaba talla baja junto a retraso mental y dismorfia facial con una duplicación parcial del gen *SHOX* y parte de la región 3', heredada de la madre, que sólo presentaba la talla baja (Benito-Sanz, 2011).

- ACH-307: lactante mujer de 3 meses con diagnóstico de displasia mesomélica de Langer que se confirma por presentar la mutación c.508C>G, p.Ala170Pro en homocigosis en el gen *SHOX* descrita por Sabherwal en una familia de etnia gitana (Sabherwal, 2004a). En este artículo, a pesar de la extensa familia sólo se consigue estudiar y caracterizar a 4 miembros: 3 afectados de DLW y 1 afecta de DL. Los 3 miembros afectados de DLW sí presentan una talla patológica pero no una deformidad de Madelung propiamente dicha aunque sí acortamiento e incurvación del antebrazo. La afecta de DL presenta una talla muy patológica: -8,5SDS aunque no se especifica más clínica.

Este aminoácido alanina 170 se ubica dentro del homeodominio del gen *SHOX*. Estudios funcionales para la mutación p.Arg173Cys, aminoácido posterior, corroboraron que esta proteína mutada no conseguía entrar en el núcleo de las células y ejercer su función como factor de transcripción (Sabherwal, 2004b). Es de suponer que, encontrándose esta alanina en la misma secuencia de 5 aminoácidos necesaria para ese tránsito al núcleo, mutaciones en ella pueden provocar los mismos efectos que las mutaciones que afectan a la arginina.

Esta misma familia está contemplada en el artículo de Barca-Tierno (2011) de las 12 que reportan con esta misma mutación. En este artículo sí que se considera que estos pacientes presentan deformidad de Madelung. En el estudio de estas 12 familias observan una penetrancia alta ya que todos los individuos afectados, excepto 1, presentan talla baja y la deformidad de Madelung. Los autores caracterizan una región común ancestral para estas familias gitanas, aparentemente no familiares entre sí, de 77 kb y que se encuentra siempre presente en una de las dos copias en los afectados LWD y en las dos copias en la DL (Barca-Tierno, 2011). El estudio mediante microsatélites realizado a la *probandus* de nuestra serie en 4 marcadores STRs en esa franja del alelo ancestral común, también mostró homocigosis para los cuatro marcadores. Los tamaños de los alelos no coinciden, aunque se asemejan, porque los cebadores para su amplificación difieren entre sí. No tenemos a los progenitores que nos permita ver en ellos una heterocigosis que además presentan consanguinidad, pero queremos dejar constar que presenta homocigosis en

esta región del alelo ancestral y que, por la situación de pertenecer a la etnia gitana, bien podría ser el ancestro común.

Con una hija afecta de displasia mesomélica de Langer, y por lo descrito en la bibliografía, era de esperar que tanto el padre como la madre de la *probandus* presentasen signos clínicos de DLW, fundamentalmente la talla baja patológica y la deformidad de Madelung. Sin embargo, sólo la madre presentaba la deformidad de Madelung. La talla era baja aunque no patológica, tanto en la madre (-1,91SDS) como en el padre (-0,99SDS). Es más, los abuelos paternos, que deben ser los portadores de la mutación, presentan tallas similares al padre. La no presencia de deformidad de Madelung ya está descrita en una paciente de etnia gitana española, con talla baja patológica, que presentaba la mutación p.Ala170Pro en heterocigosis. En este caso se descartó la deformidad por radiografía no observándose ningún tipo de deformidad o alteración en el antebrazo (Álvarez-Mora, 2012). De nuevo no se pudo estudiar más familiares de esta paciente por la no colaboración.

En nuestro caso tampoco se pudo realizar una exploración ni obtener una muestra en los progenitores por lo que no se puede dar explicación a las diferencias encontradas con la publicación de Barca-Tierno (2011).

Entre los casos negativos para el gen *SHOX* existen 5 casos de aneuploidías. Este grupo está formado por pacientes derivados de distintas especialidades con distintos criterios en los cuales, a veces, el especialista solicitaba directamente el estudio del gen *SHOX* sin haber descartado la presencia de alteraciones en el cariotipo. El proceder de la consulta de Genética Clínica es la de realización de un cariotipo ante una talla baja lo que permitió detectar estos casos:

- *2 variantes de síndrome de Turner*: ACH-118 y ACH-203. Presentaban un mosaicismo de una línea 46,XX y otra 45,X. En las pacientes afectas de síndrome Turner, la ausencia de un cromosoma X, y por tanto de un alelo del gen *SHOX*, es la causa principal del fracaso del crecimiento (Ross, 2001).
- *2 mosaicismos de aneuploidías del par sexual*:
  - ACH-124: con un cariotipo en mosaico de 3 líneas celulares: 45,X[7];46,XX[2];47,XXX[91]. Este cariotipo patológico puede justificar la infertilidad en ella porque se desconoce la proporción de cada una de las 3 líneas celulares en las gónadas, y tanto la línea de monosomía del X como la 47,XXX presentan infertilidad o subinfertilidad con un riesgo aumentado de fetos con aneuploidías (Otter, 2010; Zhong, 2012). Otra característica del síndrome de Turner es la presencia, en la mitad de las pacientes, de anomalías cardíacas, entre ellas la coartación de aorta, que la *probandus* padecía (Zhong, 2012).

Si la haploinsuficiencia del gen *SHOX* es responsable del fracaso del crecimiento, por el mismo principio, una dosis aumentada del gen *SHOX*, como la presentada por las mujeres 47,XXX da lugar a una talla más alta de lo esperado para su talla genética (Ottesen, 2010). A pesar de tener en sangre periférica una línea predominante 47,XXX presenta más características del síndrome de Turner (talla baja, coartación de aorta) lo que es un ejemplo de la dificultad del consejo genético ante un mosaicismo.

- ACH-177: una niña de 6 años con mosaicismo de una línea 45,X y otra i(Xq). El PAR1 se encuentra en el brazo corto del par sexual, por lo que la presencia de un isocromosoma de brazos largos del cromosoma X y, por tanto, ausencia del brazo corto, presentan un fenotipo de síndrome de Turner (Zhong, 2012).
- *1 síndrome de Klinefelter*: en general, y por la presencia de tres alelos del gen *SHOX*, la talla esperada en un niño afecto de síndrome de Klinefelter (47,XXY) es superior a la talla genética (Ottesen, 2010). Sin embargo, están descritos en la literatura niños afectados con talla baja por lo que la indicación es que la talla baja no excluye el diagnóstico de síndrome de Klinefelter (Rossodivita, 1994; Sanz-Marcos, 2013).

Para el diagnóstico de TBI, como se ha explicado en la introducción, uno de los requisitos es descartar, entre otros, la presencia de cromosomopatías, en las mujeres específicamente el síndrome de Turner o variantes de este síndrome. En un estudio con una cohorte de 972 pacientes enviados a la consulta del especialista por talla baja  $<-2\text{SDS}$ , 2,8% de los varones y el 9,8% de las mujeres presentaban un cariotipo patológico, con un 7,7% de niñas con síndrome de Turner (Moreno-García, 2005). Al igual que lo propuesto en las muestras prenatales, es necesario la realización del cariotipo ante la presencia de una talla baja.

Entre los resultados negativos, 16 casos, de nuevo el RCCD es uno de los diagnósticos más frecuentes (4 casos) aunque en este grupo está parejo a los 4 casos de diagnóstico final de TBI. El siguiente más frecuente son los 3 casos de talla normal baja acorde a la talla genética. Talla baja familiar sólo aparece en un caso.

#### **5.3.6.8. Grupo HCSC**

La edad media de este grupo es superior a las anteriores y esto ha permitido descartar un alto porcentaje de posibles RCCD. De los 31 casos recogidos, 3 resultaron positivos, lo que constituye un 9,7%:

- HCSC-10: niña de 10 años afecta de DLW y que presenta una delección del exón 3 del gen *SHOX* de novo. Es el único caso en todas las series en la que no existe un progenitor afecto.
- HCSC-17: el estudio familiar de este caso puso de manifiesto que los 4 miembros (progenitores, un hermano y la *probandus*) eran portadores de la delección en la región reguladora 3', todos menos el padre con talla baja sin otra manifestación. Se postula una penetrancia reducida para esta delección ya desde la primera publicación que la describió (Benito-Sanz, 2012). En este mismo artículo también hay unos progenitores ambos portadores de la delección sin consanguinidad conocida entre ellos, como ocurre en esta familia HCSC-17.
- HCSC-18: varón de 13 años con duplicación en la región 3' del gen *SHOX* fuera de la región putativa, heredada de su padre que presenta TBI. No encontramos ninguna publicación con duplicación de esta región: están descritas duplicaciones que incluyen el gen *SHOX* (Thomas, 2009), 1 duplicación que sólo incluye al región 5' en un paciente afecto TBI (Benito-Sanz, 2011) y otro paciente con TBI y duplicación en la región 3' que sí incluía la región reguladora, aunque también se encontró en un control (Fukami, 2015). *A priori* podría pensarse que no influye pero ante la talla baja del padre y la del propio probandus a los 16 años, no permite descartarla. El problema de las duplicaciones es que podemos detectarlas pero no sabemos dónde se encuentran insertadas en el genoma. Podrían situarse precisamente en el propio gen *SHOX* o en la región reguladora provocando esa anómala función de la maquinaria cis-reguladora que se ha propuesto como mecanismo patológico (Fukami, 2015).

Dentro de los 28 casos con resultado negativo, tenemos el mayor número de pacientes con diagnóstico final de TBI, 13 casos que constituye el 41,9%, probablemente por la edad de estudio superior a las anteriores. El siguiente diagnóstico más frecuente fue el de valores bajos pero dentro del rango de la normalidad acordes con la talla baja genética (6 casos). Y las TBF quedan relegadas a un tercer puesto.

#### 5.3.6.9. Asesoramiento genético

El estudio del gen *SHOX* dentro de las talla bajas ha supuesto una expectativa diagnóstica alta para los progenitores sobre todo desde que en el año 2008 se incorporan, como posibles beneficiarios al tratamiento con hormona de crecimiento sufragado por la Seguridad Social, aquellos pacientes con mutaciones en el gen *SHOX*, por lo que la solicitud de este estudio creció de forma exponencial con la consiguiente sobrecarga de trabajo al laboratorio de Genética

(Comité asesor para la hormona de crecimiento del Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008). Es entonces cuando se ve la necesidad de desarrollar unas escalas que permitan detectar los pacientes con mayor probabilidad de afectación en el gen *SHOX* para delimitar la solicitud de estudios generalizados.

En nuestra serie observamos que, exceptuando el caso ACH-162 de una mujer de 29 años con deformidad de Madelung y talla normal que solicitaba asesoramiento reproductivo, el resto de estudios eran para diagnóstico confirmatorio en infantes con talla baja, es decir, con fines diagnósticos y terapéuticos.

En el asesoramiento reproductivo solicitado por la ACH-162 se explica el patrón de herencia peculiar del gen *SHOX*: es distinto en función del sexo del portador. De modo que las mujeres sí tienen un 50% de riesgo de transmitir la enfermedad a su descendencia pero los varones tienen un porcentaje variable: si es el cromosoma Y quien porta la delección, el 60% de su descendencia masculina tendrá la mutación, al heredar el cromosoma Y, pero el otro 40% será su descendencia femenina la receptora de esa alteración.

En cuanto a los fines diagnósticos y terapéuticos, como indica Nicolosi, este gen es responsable de una parte importante de las tallas bajas con una prevalencia estimada de 1 en 1.000 nacidos, mayor que aquellos casos de tallas bajas por deficiencia de hormona de crecimiento (1:3500 recién nacidos) o por síndrome de Turner (1:2500 mujeres); por lo que su estudio parece estar indicado (Nicolosi, 2010). Sin embargo, y a pesar de encontrar una alteración en el gen *SHOX* que pueda explicar una TBI en un individuo afecto, la relación genotipo-fenotipo es pobre lo que dificulta el asesoramiento. Además más del 90% de los casos son heredados de un progenitor por lo que en la consulta hay que realizar una buena anamnesis que recoja las tallas de los progenitores, cuándo tuvieron el desarrollo puberal, la presencia de otros familiares con talla baja o displasia esquelética, junto a una radiografía que mida la edad ósea, para poder discernir la presencia de posibles RCCD y/o TBF que interfieran en el diagnóstico, ya que el tratamiento es distinto con respecto a las TBI.

Se sospecha que un porcentaje elevado de los pacientes con TBI presentan esa talla baja como resultado de un proceso poligénico en el que diferentes variantes genéticas tiene poco efecto de forma aislada pero que en su conjunto explican su baja talla (Dauber, 2014). En los últimos algoritmos desarrollados para el estudio mutacional de la talla baja se plantea el uso del exoma y de array-CGH. Estas técnicas permiten estudiar de forma masiva el genoma tanto de mutaciones puntuales de nucleótidos o pequeñas delecciones/duplicaciones de pocas bases implicadas (secuenciación masiva) como grandes delecciones/duplicaciones (array-CGH por CNVs) (Wit, 2011; Dauber, 2014). El uso de estas tecnologías de forma asistencial hoy en día presentan dificultades de interpretación por lo que, antes de realizar cualquier estudio, se debe explicar a los progenitores y al *probandus* dentro de su capacidad en función de su edad, de los be-

neficios-riesgos de estas investigaciones: posibilidad de diagnóstico vs mutaciones de significado incierto, mutaciones en genes no candidatos *a priori* e implicaciones familiares de estos estudios.

La propuesta es realizar este tipo de abordaje en pacientes con una talla baja patológica, entre -2 ó -3SDS, en los que no hay una clínica característica de ningún síndrome (Wit, 2011; Dauber, 2014).

Es en la consulta de Genética en donde se aporta toda esta información de posibles técnicas diagnósticas al *probandus* y a sus progenitores, y tras la firma de un consentimiento informado, se procede a la realización de las mismas.

## 5.4 EL ASESORAMIENTO GENÉTICO: ASPECTOS GENERALES

La gran carencia en el sistema sanitario, tanto público como privado, es la ausencia de regulación de la práctica de Genética Clínica. Con el Real Decreto 639/2014 se crea la especialidad pluridisciplinar de Genética Clínica integrada en el Tronco de Laboratorio y Diagnóstico Clínico, por lo que queda reconocida y regulada su formación por el Ministerio de Salud. Sin embargo, todavía no se ha puesto en práctica, lo que permite ejercer como genetistas a todo tipo de persona con muy distinta formación a los que no se les solicita ningún tipo de conocimiento ni de formación. Hasta la puesta en práctica del Real Decreto 639/2014, la Orden SSI/2065/2014 es un paso y reconocimiento a las competencias de la Genética Clínica.

El objetivo último del análisis genético es la realización de un asesoramiento genético personal, familiar y reproductivo. Para ello se requiere de una personal entrenado, de un espacio apropiado para realizarlo (un despacho no frecuentado), dedicar el tiempo necesario para la correcta transmisión de la información y para contestar a las preguntas que surjan. Es igual de importante entregar el mismo consejo genético de forma escrita. Se debe dar la posibilidad de solicitar una nueva cita si así lo requieren los pacientes objeto del asesoramiento.

La consulta pretest es también importante ya que se explica el procedimiento a seguir y los resultados que pueden aparecer para no levantar falsas expectativas en los pacientes e ir aceptando las posibles situaciones.

Está documentado que una pobre comunicación con el paciente aumenta los costes sanitarios, además de la ansiedad y el miedo que surge en el paciente, aceptando peor su nueva condición y las terapias que de ella puedan derivar. Se requiere de la adquisición de habilidades, tanto de empatía como de comunicación, para poder alcanzar una buena comunicación. El lenguaje que se debe utilizar ha de ser tan llano como el paciente requiera para entender la información, evitando en la medida de lo posible tecnicismos (Rosas-Blum, 2007).



Como ya se ha comentado en la introducción, un porcentaje alto de los estudios genéticos que solicitan los pacientes va dirigido a aspectos reproductivos, a la par que para la confirmación de un diagnóstico clínico. A lo largo de este trabajo, en cada uno de los epígrafes desarrollados, se ha ido introduciendo los asesoramientos genéticos realizados.

## **6. conclusiones**



## Conclusiones

### Muestras prenatales: restos abortivos y fetos

- El 30% de los fetos con progenitores no afectados que presentaron micromelia detectada a partir de una ecografía del 2º trimestre presentaron un resultado positivo en el doble abordaje de estudio de cariotipo fetal y secuenciación de las mutaciones más frecuentes del gen *FGFR3*. Por lo que se recomienda el estudio genético del cariotipo fetal y las mutaciones más frecuente del gen *FGFR3* ante un feto con micromelia *de novo* a partir de la semana 15 de gestación.
- El 60% de los fetos con progenitores no afectados que presentaron hipoplasia torácica y micromelia a partir de la ecografía del 2º trimestre presentaron un resultado positivo en el estudio de las mutaciones más frecuentes del gen *FGFR3*. Por lo que se recomienda el estudio de las mutaciones del gen *FGFR3*, comenzando con aquellas asociadas a las formas letales (codones 248, 249, 370, 373, 650 y 807). Ante un resultado negativo es recomendable realizar el cariotipo.
- El 40% de los fetos que presentaron inicialmente una micromelia aislada *de novo* con resultado normal para el cariotipo y la secuenciación del gen *FGFR3*, resultaron presentar un fenotipo dentro del rango de la normalidad. Este dato es algo superior al encontrado en la bibliografía y relevante para el asesoramiento genético.
- Ante solicitud de diagnóstico prenatal por parte de una gestante afectada de acondroplasia es más recomendable la realización de una amniocentesis que una biopsia de corion dado el mayor riesgo de pérdida fetal con esta técnica por las características óseas de estas pacientes.
- El diagnóstico clínico es de suma importancia para orientar el estudio molecular. Aportar los datos antropométricos encontrados en el feto permite aumentar las posibilidades diagnósticas.
- La toma de radiografías y fotos así como el estudio anatomopatológico en un aborto son herramientas indispensables para posibles diagnósticos diferenciales.
- En el asesoramiento de parejas no afectas con un antecedente de feto afecto con confirmación molecular, no se recomienda ninguna técnica invasiva prenatal en embarazos posteriores dada la casi nula posibilidad de recurrencia. Las nuevas técnicas de diagnóstico prenatal no invasivo son

una herramienta a ofertar ante ansiedad materna.

- En el asesoramiento de parejas no afectas con un antecedente de feto afecto sin confirmación molecular, no debe contemplarse ninguna técnica prenatal (ni invasiva ni no invasiva) en futuros embarazos ya que no se puede dirigir el estudio a una mutación conocida y la recurrencia es prácticamente nula. Sólo debe ofrecerse seguimiento ecográfico.

## **Muestras postnatales**

- El 13,3% de los pacientes con talla baja disarmónica, fenotipo de hipocondroplasia y resultado normal para las mutaciones más frecuentes del gen *FGFR3*, presentaron alteraciones en el gen *SHOX* por lo que se recomienda a pacientes con estas características el estudio seriado del gen *FGFR3* seguido del gen *SHOX*.
- Ante un resultado normal para el gen *FGFR3* y el gen *SHOX* en un paciente con talla baja disarmónica y fenotipo hipocondroplásico, es recomendable el estudio ampliado mediante las técnicas de secuenciación masiva (NGS) de otras regiones del gen *FGFR3*, del gen *COMP* y otros posibles genes candidatos así como la reevaluación clínica.
- En los pacientes afectados de craneosinostosis y sin alteración en los miembros es recomendable el estudio de la mutación p.Pro250Arg en el gen *FGFR3* para el síndrome de Muenke, y los exones 7 y 8 del gen *FGFR2* para el síndrome de Crouzon independientemente del diagnóstico clínico con el que venga solicitado. Ante un resultado normal es recomendable el estudio ampliado mediante técnicas de secuenciación masiva.
- En la caracterización clínica de nuestra serie de pacientes con talla baja y alteraciones en el gen *SHOX*, el dato más frecuentemente repetido fue el de la presencia de un familiar con talla baja idiopática, es decir, el diagnóstico final correcto era de talla baja familiar y no idiopática.
- El 25% de nuestra serie de pacientes con talla baja y alteraciones en el gen *SHOX*, presentó un crecimiento intrauterino retardado (CIR), sin embargo las recomendaciones publicadas no asocian CIR a talla baja idiopática, lo que excluye en la práctica el estudio del gen *SHOX* en estos pacientes. Por lo tanto, se requiere de series más amplias que permitan dilucidar si hay asociación o no entre ellos.
- Un 40% de nuestros casos con alteración en el gen *SHOX* y talla baja armónica presentó la delección heterocigota de la región putativa reguladora en 3'. Este dato es superior al encontrado en la bibliografía.

- En pacientes con talla baja armónica y resultado normal para el estudio del gen *SHOX* no es recomendable el estudio del gen *FGFR3* por su baja rentabilidad diagnóstica.
- El estudio del gen *SHOX* en pacientes con talla armónica normal-baja o baja requiere:
  - una anamnesis adecuada para detectar retrasos constitucionales del crecimiento y del desarrollo (RCCD) o tallas bajas familiares (TBF), ya que constituyen hasta el 70% de diagnósticos finales en nuestra serie.
  - una edad mínima de 3 años en el *probandus*, un cariotipo normal y que haya tenido un seguimiento evolutivo que descarte otras alteraciones orgánicas.
  - aplicar los resultados antropométricos a una escala clínica para el cribado de pacientes candidatos a estudio del gen *SHOX*.
- Un punto de corte <4 en la escala de Rappold tiene un valor predictivo negativo del 96%, lo que constituye una buena herramienta para la selección de pacientes candidatos a estudio del gen *SHOX*.
- Un diagnóstico genético adecuado a cada caso permite ofrecer un correcto asesoramiento genético, ayudando a las familias en la toma de decisiones para optar por la mejor opción reproductiva y al profesional clínico a predecir la prognosis del pacientes y así decidir sobre la actitud terapéutica.





## **7. bibliografía**



# Bibliografía

## a

- Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015;45(1):16-26.
- Albuisson J, Schmitt S, Baron S, Bèzieau S, Benito-Sanz S, Heath KE. Clinical utility gene card for: Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and Langer mesomelic dysplasia (LMD). *Eur J Hum Genet* 2012;20(8).
- Allanson JE. Germinal mosaicism in Apert syndrome. *Clin Genet* 1986;29(5):429-33.
- Altarascu G, Renbaum P, Brooks PB, Margalioth EJ, Ben Chetir A, Munter G, Levy-Lahad E, Eldar-Geva T. Succesful polar body-based preimplantation genetic diagnosis for achondroplasia. *Reprod Biomed Online* 2008;16(2):276-82.
- Almeida MR, Campos-Xavier AB, Medeira A, Cordeiro I, Sousa AB, Lima M, Soares G, Rocha M, Saraiva J, Ramos L, Sousa S, Marcelino JP, Correia A, Santos HG. Clinical and molecular diagnosis of the skeletal dysplasias associated with mutataions in the gene encoding Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR) in Portugal. *Clin Genet* 2009;75(2):150-6.
- Alper SL, Sharma AK. The SLC26 gene family of anion transporters and channels. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3): 494-515.
- Álvarez-Mora MI, Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Mur A, Calvo D, Pascual I, Bardají J, Milà M. A170P mutation in SHOX gene in a patient not presenting with Madelung deformity. *J Clin Pathol* 2012;65(9):488-6.
- Anthony S, Munk CR, Skakum W, Masini M. Multiple epiphyseal dysplasia. *J Am Acad Orthop Surg* 2015;23(3):164-72.

## b

- Baker KM, Olson DS, Harding CO, Pauli RM. Long-term survival in typical thanatophoric dysplasia type 1. *Am J Med Genet* 1997;70(4):427-36.
- Barbosa M, Sousa AB, Medeira A, Lourenço T, Saraiva J, Pinto-Basto J, Soares G, Fortuna AM, Superti-Furga A, Mittaz L, Reis-Lima M, Bonafé L. Clinical and molecular

- characterización of Diastrophic Dysplasia in the portuguese population. *Clin Genet* 2010;80(6):550-7.
- Barca-Tierno V, Aza-Carmona M, Barroso E, Heine Suner D, Azmanov D, Rossell J, Ezquieta B, Montané LS, Vendrell T, Cruz J, Santos F, Rodríguez JI, Pozo J, Argente J, Kalaydjieva L, Gracia R, Campos-Barros A, Benito-Sanz S, Heath KE. Identification of a Gypsy SHOX mutation (p.A170P) en Léri-Weill dyschondrosteosis and Langer mesomelic dysplasia. *Eur J Hum Genet* 2011;19(12):1218-25.
- Barrett AN, Chitty LS. Developing noninvasive diagnosis for single-gene disorders: the role of digital PCR. *Methods Mol Biol* 2014;1160:215-28.
- Barroso E, Benito-Sanz S, Belinchón A, Yuste-Checa P, Gracia R, Aragonés A, Campos-Barros A, Heath KE. Identificación of the first de novo PAR1 deletion downstream of SHOX in an individual diagnosed with Léri-Weil dyschondrosteosis (LWD). *Eur J Med Genet* 2010;53(4):204-7.
- Baujat G, Legeao-Mallet L, Finidori G, Cormier-Daire V, Le Merrer M. Achondroplasia. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22(1):3-18.
- Belin V, Cusin V, Viot G, Girlich D, Toutanin A, Moncla A, Vekemans M, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V. SHOX mutations in dyschondrosteosis (Leri-Will syndrome). *Nat Genet* 1998;19(1):67-9.
- Bellus GA, McIntosh I, Smith EA, Aylsworth AS, Kaitila I, Horton WA, Greenhaw GA, Hecht JT, Francomano CA. A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nat Genet* 1995;10(3):357-9.
- Bellus GA, Gaudenz K, Zackai EH, Clarke LA, Szabo J, Francomano CA, Muenke M. Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. *Nat Genet* 1996;14(2):174-6.
- Bellus GA, Bamshad MJ, Przylepa KA, Dorst J, Lee RR, Hurko O, Jabs EW, Curry CJ, Wilcox WR, Lachman RS, Rimo DL, Francomano CA. Severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans (SADDAN): phenotypic analysis of a new skeletal dysplasia caused by a Lys650Met mutation in fibroblast growth factor receptor 3. *Am J Med Genet* 1999;85(1):53-65.
- Bellus GA, Spector EB, Speiser PW, Weaver CA, Garber AT, Bryke CR, Israel J, Rosengren SS, Webster MK, Donoghue DJ, Francomano CA. Distinct missense mutations of the *FGFR3* Lys650 codon modulate receptor kinase activation and the severity of the skeletal dysplasia phenotype. *Am J Hum Genet* 2000;67(6):1411-21.
- Benito-Sanz S, Thomas NS, Huber C, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Crolla JA, Maloney V, Rappold G, Argente J, Campos-Barrós A, Cormier-Daire V, Heath KE. A novel class of pseudoautosomal region 1 deletions downstream of SHOX is associated with Léri-Weill Dyschondrosteosis. *Am J Hum Genet* 2005;77(4):533-44.
- Benito-Sanz S, Gorbenko del Blanco D, Aza-Carmona M, Magano LF, Lapunzina P, Argente J, Campos-Barros A, Heath KE. PAR1 deletions downstream of SHOX are the most frequent defect in a spanish cohort of Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) probands. *Hum Mutat* 2006;27(10):1062.
- Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suñer D, Hisado-Oliva A, Romanelli V, Rosell J, Aragonés A, Caimari M, Argente J, Ross JL, Ross JL, Zinn AR, Gracia R, Lapunzina P, Campos-

- Barros A, Heath KE. Clinical and molecular evaluation of SHOX/PAR1 duplications in Léri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS). *J Clin Endocrinol Metab* 2011 96(2):E404-12.
- Benito-Sanz S, Aza-Carmona M, Rodríguez-Estévez A, Rica-Etxebarria I, Gracia R, Campos-Barrós A, Heath KE. Identification of the first PAR1 deletion encompassing upstream SHOX enhancers in a family with idiopathic short stature. *Eur J Hum Genet* 2012;20(1):127-7.
- Binder G, Ranke MB, Martin DD. Auxology is a valuable instrument for the clinical diagnosis of SHOX haploinsufficiency in school-age children with unexplained short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(10):4891-6.
- Binder G, Renz A, Martínez A, Keselman A, Hesse V, Riedl SW, Häusler G, Fricke-Otto S, Frisch H, Heinrich JJ, Ranke MB. SHOX haploinsufficiency and Léri-Weill dyschondrosteosis: prevalence and growth failure in relation to mutation, sex, and degree of wrist deformity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(9):4403-8.
- Binder G. Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype and therapy. *Horm Res Paediatr* 2011;75(2):81-9.
- Bodian DL, McCutcheon JN, Kothiyal P, Huddleston KC, Iyer RK, Vockley JG, Niederhuber JE. Germline variation in cancer-susceptibility genes in a healthy, ancestrally diverse cohort: implications for individual genome sequencing. *PloS One* 2014;9(4):e94554.
- Bonafe L, Schmitt K, Eich G, Giedion A, Superti-Furga A. RMRP gene sequence analysis confirms a cartilage-hair hypoplasia variant with only skeletal manifestations and reveals a high density of single-nucleotide polymorphisms. *Clinical Genetics* 2002;61(2):146-151.
- Bonaventure J, Rousseau F, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, Maroteaux P. Common mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene account for achondroplasia, hypochondroplasia, and thanatophoric dwarfism. *Am J Med Genet* 1996;63(1):148-54.
- Borie C, Léger J, Dupuy O, Hassan M, Ledu N, Lebbar A, Czernichow P, Eydoux P. Translocation (Y;22) resulting in the loss of SHOX and isolated short stature. *Am J Med Genet A* 2004;125(A):186-90.
- Boulet S, Althuser M, Nuges F, Schaa JP, Jouk PS. Prenatal diagnosis of achondroplasia: new specific signs. *Prenat Diagn* 2009;29(7):697-702.
- Bowen P. Achondroplasia in two sisters with normal parents. *Birth Defects* 1974;10(12):31-6.
- Berk DR, Spector EB, Bayliss SJ. Familial acanthosis nigricans due to K650T FGFR3 mutation. *Arch Dermatol* 2007;143(9):1153-6.
- Briggs MD, Hoffman SM, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, Mortier GR, Rimo DL, Lachman RS, Gaines ES, Cekleniak JA, Knowlton RG, Cohn DH. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat Genet* 1995;10(3):330-6.

- Briggs MD, Chapman KL. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations. *Hum Mutat* 2002;19(5):465-78.
- Briggs MD, Brock J, Ramsden SC, Bell P. Genotype to phenotype correlations in cartilage oligomeric matrix protein associated chondrodysplasias. *Eur J Hum Genet* 2014;22(11):1278-82.
- Brzustowicz LM, Allitto BA, Matseoane D, Theve R, Michaud L, Chatkupt S, Sugarman E, Penchaszadeh GK, Suslak L, Koenigsberger MR, Gilliam TC, Handelin BL. Paternal isodisomy for chromosome 5 in a child with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 1994;54(3):482-8.
- Buchanan EPI, Xue AS, Hollier LH Jr. Craniofacial syndromes. *Plas Reconstr Surg* 2014;134(1):128e-153e.
- Burke D, Wilkes D, Blundell TL, Malcolm S. Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. *Trends Biochem Sci* 1998;23(2):59-62.
- Bustamante-Aragonés A, González-González C, de Alba MR, Aínsa E, Ramos C. Noninvasive prenatal diagnosis using cfDNA in maternal blood: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10(2):197-205.
- Büttner G. Etiology and pathogenesis of Perthes' disease; also a case of tripartite patella. *Arch Klin Chir* 1925;136:703-15.

## C

- Capone L, Iughetti L, Sabatini S, Bacciaglia A, Forabosco A. The SHOX region and its mutations. *J Endocrinol Invest* 2010;33(6 Suppl):11-4.
- Carrascosa A, Fernández Longás A, Gracia Bouthelier R, López Siguero JP, Pombo Arias M, Yturriaga R, Grupo Español de Consenso. Idiopathic short stature. A literature review and update. *An Pediatr (Barc)* 2011;75(3):204.e1-11.
- Carvajal N, Martínez-García M, Chayogan M, Morcillo N, Pino A, Lorda I, Trujillo-Tiebas MJ. Clinical, genetics and bioinformatics characterization of a Campomelic dysplasia case report. Publicación en proceso.
- Chen T-LL, Posey KL, Hecht JT, Vertel BM. COMP mutations: domain-dependent relationship between abnormal chondrocyte trafficking and clinical PSACH and MED phenotypes. *J Cell Biochem* 2008;10(3):778-87.
- Chen J, Widhardt G, Zhong Z, Röth R, Weiss B, Steinberger D, Decker J, Blum WF, Rappold G. Enhancer deletion of the SHOX gene as a frequent cause of short stature: the essential role of a 250 kb downstream regulatory domain. *J Med Genet* 2009;46(12):834-9.
- Chitayat D, Fernandez B, Gardner A, Moore L, Glance P, Dunn M, Chun K, Sgro M, Ray P, Allingham-Hawkins D. Compound heterozygosity for the achondroplasia-hypochondroplasia FGFR3 mutations: prenatal diagnosis and postnatal outcome. *Am J Med Genet* 1999;84(5):401-5.

- Chitty LS, Griffin DR, Meaney C, Barrett A, Khalil A, Pakr E, Cole TJ. New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011;37(3):283-9.
- Chun K, Teebi AS, Azimi C, Steele L, Ray PN. Screening of patients with craniosynostosis: molecular strategy. *Am J Med Genet A* 2003;120A(4):470-3.
- Cohen J. En: Statistical power analysis for the behavioral sciences. 1988. 2ªed. Hillsdale, New Jersey, Lawrence Erlbaum Associates.
- Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, Chernausk SD, Savage MO, Wit JM, 2007 ISS Consensus Workshop participants. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(11):4210-7.
- Comité asesor para la hormona de crecimiento del Ministerio de Sanidad y Consumo. <http://www.msssi.gob.es/profesionales/farmacia/pdf/criteriosHCninos020908.pdf> Aprobado el 20 de mayo de 2008.
- Cordone M, Lituanica M, Bocchino G, Passamonti U, Tomà P, Camera G. Ultrasonographic features in a cases of heterozygous achondroplasia at 25 weeks' gestation. *Prenat Diagn* 1993;13(5):395-401.
- Cortina Orts H. La radiología en las tallas bajas disarmónicas: Displasias óseas. *Rev Esp Endocrinol Pediat* 2015;6:13-30.

## d

- Dakouane Giudicelli M, Serazin V, Le Sciellour CR, Albert M, Selva J, Giudicelli Y. Increased achondroplasia mutation frequency with advanced age and evidence for G1138A mosaicism in human testis biopsies. *Fertil Steril* 2008;89(6):1651-6.
- Darendeliev F, Karafiannis G, Wilton P. Headache, idiopathic intracranial hypertension and slipped capital femoral epiphysis during growth hormone treatment: a safety update from the KIGS database. *Horm Res* 2007;68(Suppl 5):41-7.
- Dauber A, Rosenfeld RG, Hirschhorn JN. Genetic evaluation of short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(9):3080-92.
- de Azevedo-Moreira LM, Matos MA, Schiper PP, Carvalho AF, Goimez IC, Rolemberg JC, Ferreira de Lima RL, Toralles MB. Co-occurrence of achondroplasia and Down syndrome: Genotype/phenotype association. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88(4):228-31.
- De Rosa ML, Fano V, Araoz HV, Chetkoff L, Pregon MG. Homozygous N542K hypochondroplasia--first report: radiological and clinical features. *Am J Med Genet A* 2014;164A(7):1784-8.

- Decker E, Durand C, Bender S, Rödelperger C, Glaser A, Hecht J, Scheneider KU, Rappold G. FGFR3 is a target of the homeobox transcription factor SHOX in limb development. *Hum Mol Genet* 2011;20(8):1524-35.
- Deere M, Sandfor T, Ferguson HL, Daniels K, Hecht JT. Identification of twelve mutations in cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in patients with pseudoachondroplasia. *Am J Med Genet* 1998;80(5):510-13.
- Deere M, Sandfor T, Francomano CA, Daniels K, Hecht JT. Identification of nine novel mutations in cartilage oligomeric matrix protein in patients with pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Am J Med Genet* 1999;85(5): 486-90.
- Delobel B, Djlelati R, Gabriel-Robez O, Croquette MF, Rousseaux-Prevost R, Tousseaux J, Rigot JM, Rumpler Y. Y-autosome translocation and infertility: usefulness of molecular, cytogenetic and meiotic studies. *Hum Genet* 1998;102(1):98-102.
- Deutz-Terlouw PP, Losekoot M, Aalfs CM, Hennekam RC, Bakker E. Asn540Thr substitution in the fibroblast growth factor receptor 3 tyrosine kinase domain causing hypochondroplasia. *Hum Mutat* 1998;Suppl 1:S62-5.
- Doherty ES, Lacbawan F, Hadley DW, Brewer C, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B, Rosenbaum K, Domingo DL, Hart TC, Brooks BP, Immken L, Lowry RB, Kimonis V, Shanske AL, Jehee FS, Bueno MR, Knightly C, McDonald-McGinn D, Zackai EH, Muenke M. Muenke syndrome (FGFR3-related craniosynostosis): expansion of the phenotype and review of the literature. *Am J Med Genet A* 2007;143A(24):3204-15.
- Dumic D, Barisic I, Potocki K, Sansovic I. Hypochondroplasia due to FGFR3 gene mutation (N540K) and mosaic form of Down syndrome in the same patient. *J Appl Genet* 2011;52(2):209-12.
- Durand C, Bangs F, Signolet J, Decker E, Tickle C, Rappold G. Enhancer elements upstream of the SHOX gene are active in the developing limb. *Eur J Hum Genet* 2010;18(5):527-32.

## e

- Eggermann T, Soellner L, Buiting K, Kotzot D. Mosaicism and uniparental disomy in prenatal diagnosis. *Trends Mol Med* 2015;21(2):77-87.
- Elfayomy AK, Almasry SM. Effects of a single course versus repeated courses of antenatal corticosteroids on fetal growth, placental morphometry and the differential regulation of vascular endothelial growth factor. *J Obstet Gynaecol Res* 2014;40(11):2135-45.
- Ellison JW, Wardak Z, Webster M, Chiong W. PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome (Abstract). *Am J Hum Genet* 1996;59(Suppl):A32.
- Engel E. A fascination with chromosome rescue in uniparental disomy: Mendelian recessive outlaws and imprinting copyrights infringements. *Eur J Hum Genet* 2006;14(11):1158-69.



Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth-factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(2):139-49.

Evers C, Heidemann PH, Dunsthermier D, Schulze E, Haag C, Janssen JW, Fischer C, Jauch A, Moog U. Pseudoautosomal inheritance of Léri-Weill syndrome: what does it mean? *Clin Genet* 2011;79(5):789-94.

## f

Faltas BM, Karir BS, Tagawa ST, Rosenberg JE. Novel molecular targets for urothelial carcinoma. *Expert Opin Ther Targets* 2015;19(4):515-25.

Fenollar-Cortés M, Lara-Orejas E, González-Meneses A, Ruibal-Francisco JL, Trujillo-Tiebas MJ. Clinical and molecular diagnostics of a cartilage-hair hypoplasia: two new cases. *An Pediatr (Barc)* 2015;82(6):436-9.

Friez MJ, Wilson JA. Novel FGFR3 mutations in exon 7 and implications for expanded screening of achondroplasia and hypochondroplasia: a response to Heuertz et al. *Eur J Hum Genet* 2008;16(3):277-8.

Fujita T, Yuno M, Okuzaki D, Ohki R, Fujii H. Identification of non-coding RNAs associated with telomeres using a combination of enChIP and RNA Sequencing. *PLoS ONE* 2015;10(4):e0123387.

Fukami M, Matsuo N, Hasegawa T, Sato S, Ogata T. Longitudinal auxological study in a female with SHOX (short stature homeobox-containing gene) haploinsufficiency and normal ovarian function. *Eur J Endocrinol* 2003;149(4):337-41.

Fukami M, Kato F, Tajima T, Yokoya S, Ogata T. Transactivation function of an approximately 800-bp evolutionarily conserved sequence at the SHOX 3' region: implication for the downstream enhancer. *Am J Hum Genet* 2006;78(1):167-70.

Fukami M, Daketi S, Kato F, Hasegawa Y, Mochizuki H, Horikawa R, Ogata T. Identification and characterization of cryptic SHOX intragenic deletions in three Japanese patients with Léri-Weill dyschondrosteosis. *J Hum Genet* 2008;53(5):454-9.

Fukami M, Naiki Y, Muoria K, Hamajima T, Soneda S, Horikawa R, Jinno T, Katsumi M, Nakamura A, Asakura Y, Adachi M, Ogata T, Kanzaki S, Japanese SHOX study group. Rare pseudoautosomal copy-number variations involving SHOX and/or its flanking regions in individuals with and without short stature. *J Hum Genet* 2015;60(9):553-6.

## g

García L, Carrascosa A, Caveda E, Del Valle J, Duque N, Fernández Longás et al. Prevalence of idiopathic short stature in a pediatric population attending endocrinology clinics in Spain (P01-077). *LWPE-ESPE* 2009.

- García MM, Vélez C, Fenollar-Cortés M, Bustamante-Aragonés A, Lorda-Sánchez I, Soriano-Guillén L, Trujillo-Tiebas MJ: Paternal isodisomy of chromosome 5 in a patient with recessive multiple epiphyseal dysplasia. *Am J Med Gener A* 2014;164A(4):1075-8.
- Gatta V, Antonucci I, Morizio E, Palka C, Fischetto R, Mokini V, Tumini S, Calabrese G, Stuppia L. Identification and characterization of different SHOX gene deletions in patients with Léri-Weill dyschondrosteosis by MLPA assay. *J Hum Genet* 2006;52(1):21-7.
- Gatta V, Palka C, Chiavari V, Franchi S, Cannataro G, Savastano M, Cotroneo AR, Chiarelli F, Mohn A, Suppia L. Spectrum of phenotypic anomalies in four families with deletion of the SHOX enhancer region. *BMC Med Genet* 2014;23;15:87.
- Ghosh A, Higgins L, Larkins SA, Miller C, Ostojic N, Martin WL, Kiby MD. Prenatal diagnosis and prenatal imaging of a de novo 46,X,der(Y)t(X;Y)(p22.13;q11.23) leading to functional disomy of the distal end of the X chromosome short arm from Xp22.13 in a phenotypically male fetus with posterior fossa abnormalities. *Prenat Diagn* 2008;28(11):1068-71.
- Glaser RL, Jiang W, Boyadjev SA, Tran AK, Zachary AA, Van Maldergem L, Johnson D, Walsh S, Oldbridge M, Wall SA, Wilkie AO, Jabs EW. Paternal origin of FGFR2 mutations in sporadic cases of Crouzon syndromes and Pfeiffer syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;66(3):768-7.
- Gollust SE, Apse K, Fuller BP, Miller PS, Biesecker BB. Community involvement in developing policies for genetic testing: assessing the interest and experiences of individuals affected by genetic conditions. *Am J Public Health* 2005;95(1):35-41.
- Goncalves L, Jeanty P. Fetal biometry of skeletal dysplasias: a multicentric study. *J Ultrasound Med.* 1994;13(10):767-75.
- Goriely A, Wilkie AOM. Paternal age effect mutations and selfish spermatogonial selection: causes and consequences for human disease. *Am J Hum Genet* 2012;90(2):175-200.
- Gorlin RJ, Cohen MJ Jr, Levin LS. Syndromes of the head and neck. New York: Oxford University Press; 1990.
- Grigeliuniene G, Hagenäs L, Ekiöf O, Neumeyer L, Haereid PE, Anvret M. A novel missense mutation Ile538Val in the fibroblast growth factor receptor 3 in hypochondroplasia, Mutations in brief no. 122. Online. *Hum Mutat* 1998;11(4):333.
- Grigeliuniene G, Eklöf O, Ivarsson SA, Westphal O, Neumeyer L, Kedra D, Dumanski J, Hagenäs L. Mutations in short stature homeobox containing gene (SHOX) in dyschondrosteosis but not in hypochondroplasia. *Hum Gene* 2000;107(2):145-9.
- Grigeliuniene G, Schoumans J, Neumeyer L, Ivarsson A, Ekiöf O, Enkvist O, Tordai P, Fosdal I, Myhre AG, Westphal O, Nilsson NO, Elfving M, Ellis I, Anderlid BM, Fransson I, Tapiá-Paez I, Nordenskjöld M, Hagenäs L, Dumanski JP. Analysis of short stature homeobox-containing gene (SHOX) and auxological phenotype in dyschondrosteosis and isolated Madelung deformity. *Hum Genet* 2001;109(5):551-8.
- Guo WS, Hsu TT, Chang SY, Chang JC, Huang CC. Second trimester diagnosis of thanatophoric dysplasia. *Changcheng Yi Xue Za Zhi* 1996;19(3):258-63.

## h

- Handsyde AH, Lesko JG, Tarín JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnosis testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992;327(13):905-9.
- Hassold T, Abruzzo M, Adkins K, Griffin D, Merrill M, Millie E, Saker D, Shen J, Zaragoza M. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. *Environ Mol Mutagen* 1996;28(3):167-75.
- Hästbacka J, Superti-Furga A, Wilcox WR, Rimoin DL, Cohn DH, Lander ES. Atelosteogenesis type II is caused by mutations in the diastrophic dysplasia sulfate-transporter gene (DTDST): evidence for a phenotypic series involving three chondrodysplasias. *Am J Hum Genet* 1996;58(2):255-62.
- He L, Horton W, Hristova K. Physical basis behind achondroplasia, the most common form of human dwarfism. *J Bio Chem*. 2010;285(39):30103-14.
- Hecht JT, Nelson LD, Crowder E, Wang Y, Elder FF, Harrison WR, Francomano CA, Pranger CK, Lennon GG, Deere M, Lawler J. Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia. *Nat Genet* 1995;10(3):325-9.
- Helman SN, Badhey A, Kadakia S, Myers E. Revisiting Crouzon syndrome: reviewing the background and management of a multifaceted disease. *Oral Maxillofac Surg* 2014;18(4):373-9.
- Henderson S, Silence D, Loughlin J, Bennetts B, Sykes B. Germline and somatic mosaicism in achondroplasia. *J Med Genet* 2000;37(12):956-8.
- Hermanns P, Bertuch AA, Bertin TK, Dawson B, Schmitt ME, Shaw C, Zabel B, Lee B. Consequences of mutations in the non-coding RMRP RNA in cartilage-hair hypoplasia. *Hum Mol Genet* 2005;14(23):3723-40.
- Hernandez M, Castellet J, Narvaiza JL, Rincón JM, Ruíz I, Sánchez E, Sobradillo B, Zurimendi A. Curvas y tablas de crecimiento. Fundación Orbegozo. 1988.
- Heurtz S, Le Merrer M, Zabel B, Wright M, Legaeai-Mallet L, Cormier-Daire V, Gibbs L, Bonaventure J. Novel *FGFR3* mutations creating cysteine residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia. *Eur J Hum Genet* 2006;14(12):1240-7.
- Hicks J. Achondroplasia family of skeletal dysplasias. En: The National Organisation for Rare Disorders, Inc, editors. NORD guide to rare disorders. 2003. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 144p.
- Horn D, Rupperecht E, Kunze J, Spranger J. Anauxetic dysplasia, a spondylometaphyseal dysplasia with extreme dwarfism. *J Med Genet* 2001;38(4):262-5.
- Horton WA, Harris DJ, Collins DL. Discordance for the Kleeblattschädel anomaly in monozygotic with thanatophoric dysplasia. *Am J Med Genet* 1983;15(1):97-101.

Huang H, Sun M, Li X, Jin J. Urothelial carcinoma of the bladder in patients aged 30 years or younger: clinicopathological analysis and expression of fibroblast growth-factor receptor 3 (FGFR3) of 45 cases. *Med Oncol* 2015;32(5):581.

Huggins MJ, Mernagh JR, Steele L, Smith JR, Nowaczyk MJ. Prenatal sonographic diagnosis of hypochondroplasia in a high-risk fetus. *Am J Med Genet* 1999;87(3):226-9.

Hunter AGW, Rudd NL. Craniosynostosis. I. Sagittal synostosis: its genetics and associated clinical findings in 214 patients who lacked involvement of the coronal suture(s). *Teratology* 1976;14(2):185-94.

Hunter AGW, Rudd NL. Craniosynostosis. II. Coronal synostosis: its familiar characteristics and associated clinical findings in 109 patients lacking bilateral polysyndactyly or syndactyly. *Teratology* 1977;15(3):301-10.

Hurst JA, Firth HV, Smitsson S. Skeletal dysplasias. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005;10(3):233-41.

Hyland VJ, Robertson SP, Flanagan S, Savarirayan R, Rosciolo T, Masel J, Hayes M, Glass IA. Somatic and germline mosaicism for a R248C missense mutation in FGFR3, resulting in a skeletal dysplasia distinct from thanatophoric dysplasia. *Am J Med Genet A* 2003;120A(2):157-68.

## i

Ikewaga S, Ohashi H, Nishimura G, Kim KC, Sannohe A, Kimizuka M, Fukusima Y, Nagai T, Nakamura Y. Novel and recurrent COMP (cartilage oligomeric matrix protein) mutations in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Hum Genet* 1998;103(6):633-8.

Ip EW, Gaspar HB, Kleta R, Chanudet E, Bacchelli C, Pittis A, Nademi Z, Davies EG, Slatter MA, Amrolia P, Rao K, Veys P, Gennery AR, Qasim W. Variable phenotype of severe immunodeficiencies associated with RMRP gene mutations. *J Clin Immunol* 2015;35(2):147-57.

Ismail H, Ness K. Evaluation of short stature in children. *Pediatr Ann* 2013;42(11):217-22.

Itsukaichi M, Kikuchi A, Yoshihara K, Serikawa T, Takakuwa K, Tanaka K. Changes in fetal circulation associated with congenital heart disease and their effects on fetal growth. *Fetal Diagn Ther* 2011;30(3):219-24.

## j

Jackson GC, Mittaz-Crettol M, Taylor JA, Mortier GR, Spranger J, Zabel B, Le Merrer M, Cormier-Daire V, Hall CM, Offiah A, Wright MJ, Savarirayan R, Nishimura G, Ramsden SC, Elles R, Bonafe L, Superti-Furga A, Unger ÇS, Zankl A, Briggs MD. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: a 7-year comprehensive analysis of the known disease genes identify novel and recurrent mutations and

provides an accurate assessment of their relative contribution. *Hum Mutat* 2011;33(1):144-57.

Jauniaux E, Brown R, Snijders RJ, Noble P, Nicolaides KH. Early prenatal diagnosis of triploidy. *Am J Obstet Gynecol* 1997;17(6):550-4.

Johnson D, Wilkie AO. Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet* 2011;19(4):369-76.

Jones SM, Robinson LK, Sperrazza R. Prenatal diagnosis of skeletal dysplasia identified postnatally as hypochondroplasia. *Am J Med Genet* 1990;36(4):404-7.

Jorge AA, Souza SC, Nishi MY, Billerbeck AE, Libório DC, Kim CA, Arnhold IJ, Mendonca BB. SHOX mutation in idiopathic short stature and Léri-Weill dyschondrosteosis: frequency and phenotypic variability. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;66(1):130-5.

Jorgez GJ, Weedon JW, Sahin A, Tannour-Louet M, Han S, Bournat JC, Mielnik A, Cheung SW, Nangia AK, Schlengel PN, Lipshultz LI, Lamb DJ. Aberrations in pseudoautosomal regions (PARs) found in infertile men with Y-Chromosome microdeletions. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(4):E674-9.

## k

Kaga A, Murotsuki J, Kamimura M, Kimura M, Saito-Hakida A, Kanno J, Hoshi K, Kure s, Fujiwara I. Association of achondroplasia with Down syndrome: difficulty in prenatal diagnosis by sonographic and 3-D helical computed tomographic analyses. *Congenit Anom (Kyoto)* 2014.

Kan SH, Elanko N, Johnson D, Cornejo-Roldan L, Cook J, Reich EW, Tomkins S, Verloes A, Twigg SR, Rannan-Eliya S, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Wall SA, Muenke M, Wilkie AO. Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 2002;70(2):472-86.

Kant SG, Wit JM, Breuning. Genetic analysis of short stature. *Horm Res* 2003;60(4):157-65.

Kant SG, van der Kamp HJ, Kriek M, Bakker E, Bakker B, Hoffer MJ; van Bunderen P, Losekoot M, Maas SM, Wit JM, Rappold G. The jumping SHOX gene—crossover in the pseudoautosomal region resulting in unusual inheritance of Leri-Weill dyschondrosteosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(2):E356-9.

Karadimas C, Sifaki s, Valsamopoulos P, Makatsoris C, Velissariou V, Nasioylas G, Petersen MB, Koumantakis E, Hatzaki A. Prenatal diagnosis of hypochondroplasia: report of two cases. *Am J Med Genet A* 2006;140(9):998-1003.

Kataoka S, Sawai H, Yamada H, Kanazawa N, Koyama K, Nishimura G, Morikawa M, Sakuragi N, Minakami H. Radiographic and genetic diagnosis of sporadic hypochondroplasia early in the neonatal period. *Prenat Diagn* 2004;24(1):45-9.

Kemp SF. Growth hormone treatment of idiopathic short stature: history and demographic data from the HCGS. *Growth Horm IGF Res* 2005;15(Suppl A):S9-12.

- Kennedy J, Jackson G, Ramsden S, Taylor J, Newman W, Wright MJ, Donnai D, Elles R, Briggs MD. COMP mutations screening as an aid for the clinical diagnosis and counselling of patients with a suspected diagnosis of pseudoachondroplasia or multiple epiphyseal dysplasia. *Eur J Hum Genet* 2005;13(5):547-55.
- Khalil A, Morales-Roselló J, Morlando M, Bhide A, Papageorgiou A, Thilaganathan B. Widening of the femoral proximal diaphysis-metaphysis angle in fetuses with acondroplasia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;44(1):69-75.
- Kitoh H, Brodie SG, Kupke KG, Lachman RS, Wilcox WR. Lys650Met substitution in the tyrosine kinase domain of the fibroblast growth factor receptor gene causes thanatophoric dysplasia Type I. Mutations in brief no. 199. Online. *Hum Mutat* 1998;12(5):362-3.
- Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Wong WSW, Sigurdsson G, Walters GB, Steinberg S, Helgason H, Thorleifsson G, Gudjarstsson DF, Helgason A, Magnusson OT, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Rate of *de novo* mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 2012;488(7142):471-5.
- Krakow D, Alanay Y, Rimoin LP, Lin V, Wilcox Wr, Lachman RS, Rimoin DL. Evaluation of prenatal-onset osteochondrodysplasias by ultrasonography: a retrospective and prospective analysis. *Am J Med Genet A* 2008;146A(15):1917-24.
- L**
- Lajeunie E, Le Merrer M, Bonaïti-Pellie C, Marchac D, Renier D. Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. *Am J Med Genet* 1995;55(4):500-4.
- Lajeunie E, Le Merrer M, Bonaïti-Pellie C, Marchac D, Renier D. Genetic study of scaphocephaly. *Am J Med Genet* 1996(3);62:285-5.
- Lajeunie E, Heuertz S, El Ghouzzi V, Martinovic J, Renier D, Le Merrer M, Bonaventure J. Mutation screening in patients with syndromic craniosynostosis indicates that a limited number of recurrent *FGFR2* mutations accounts for severe forms of Pfeiffer syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006;14(3):289-98.
- Langer Lo Jr, Yang SS, Hall JG, Sommer A, Kottamasu SR, Golabi M, Krassikoff N. Thanatophoric dysplasia and cloverleaf skull. *Am J Med Genet Suppl.* 1987;3:167-79.
- Langer LO. Mesomelic dwarfism of the hypoplastic ulna, fibula, mandible type. *Radiology* 1967;89(4):654-60.
- Lenzini E, Pecile V, Cleva L, Faletra F, Cappellani S, Bedon L, Gambel Benussi D. A patient with segmental isodisomy on 5q11.2-qter and deletion 5q11.1q11.2. *Chromosome Res* 2015;23(Suppl1):S53.
- Léri A, Weill J. Une affection congénitale et symétrique fu développement osseux: la dyschondrostéose. *Bull Mém Soc Med Hosp* 1929;35:1491-4.

- Ley Orgánica 2/2010, de 3 de marzo, de salud sexual y reproductiva y de la interrupción voluntaria del embarazo. BOE, nº 55, Sec. I, Pág. 21001.
- Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. BOE, nº159, Pág. 28826.
- Li Y, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Holzgreve W, Hahn S. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay. *Prenat Diagn* 2007;27(1):11-7.
- Lin SP, Huang SY, Tu ME, Wu YH, Lin CY, Lee-Chen GJ. Netherton syndrome: mutation analysis of two Taiwanese families. *Arch Dermatol Res* 2007;299(3):145-50.
- Lindsay R, Feldkamp m, Harris D, Robertoson D, Rallison M, Utah Growth study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *J Pediatr* 1994;125(1):29-35.
- Linnankivi T, Mäktie O, Valanne L, Toiviainen-Salo S. Neuroimaging and neurological findings in patients with hypochondroplasia and FGFR3 N540K mutation. *Am J Med Genet A* 2012;158A(12):3119-25.
- Liu X, Zhang W, Geng D, He J, Zhao Y, Yu L. Clinical significance of fibroblast growth factor receptor-3 mutations in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Genet Mol Res* 2014;13(1):1109-20.
- Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, Chow KC, Lo WY, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Cantor CR, Chiu RW, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(50):19920-5.

## m

- Madelung V. Die spontane subluxacion der Hand nach Vorne. *Arch Klin Chir* 1878;23:395-412.
- Maddox BK, Keene DR, Sakai LY, Charbonneau NL, Morris NP, Ridgway CC, Boswell BA, Sussman MD, Horton WA, Bachinger HP, Hecht JT. The fate of cartilage oligomeric matrix protein is determined by the cell type in the case of a novel mutation in pseudoachondroplasia. *J Bio Chem* 1997;272(49):30993-7.
- Maida Y, Yasukawa M, Furuuchi M, Lassmann T, Possemato R, Okamoto N, Kasim V, Hayashizaki Y, Hahn WC, Masutomi K. An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature* 2009;461(7261):230-235.
- Makrythanasis P, Temtamy S, Aglan MS, Otafi GA, Hamamy H, Antonarakis SE. A novel homozygous mutation in FGFR3 causes tall stature, severe lateral tibial deviation, scoliosis, hearing impairment, camptodactyly and arachnodactyly. *Hum Mutat* 2014;35(8):959-63.
- Mäktie O, Geiberger S, Horemuzova E, Hagenäs L, Mostrom E, Nordenskjöld M, Grigelioniene G, Nordgren A. SLC26A2 disease spectrum in Sweden-high frequency of recessive multiple epiphyseal dysplasia (rMED). *Clin Genet* 2015;87(3):27-8.



- Mamada M, Yorifuji T, Kurokawa M, Momoi T, Nakahata T. Prevalence of mutations in the FGFR3 gene in individuals with idiopathic short stature. *Clin Pediatr Endocrinol* 2006;15(2):61-4.
- Manickam K, Donoghue DJ, Meyer AN, Snyder PJ, Prior TW. Suppression of severe achondroplasia with development delay and acanthosis nigricans by the p.Thr651Pro mutation. *Am J Med Genet A* 2014;164A(1):243-50.
- Marchini A, Marttila T, Winter A, Caldeira S, Malanchi I, Blaschke RJ, Häcker B, Rao E, Karperien M, Wit JM, Richter W, Tommasino M, Rappold GA. The short stature homeodomain protein SHOX induces cellular growth arrest and apoptosis and is expressed in human growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* 2004;279(35):37103-4.
- Marchini A, Rappold G, Schneider KU. SHOX at a glance: from gene to protein. *Arch Physiol Biochem* 2007;113(3):116-23.
- Maroteaux P, Lamy M. Les formes pseudo-achondroplastiques des dysplasies spondyli-epiphysaires. *Press Med* 1959;67:383-6.
- Maroteaux P, Lamy M, Robert JM. Lenanisme thanatophore. *Press Med* 1967;75(49):2519-24.
- Marquis-Nicholson R, Aftimos S, Love DR. Molecular analysis of a case of thanatophoric dysplasia reveals two de novo *FGFR3* missense mutations located in cis. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2013;13(1):80-7.
- Martin LA, Assif N, Gilbert M, Wijewarnasuriya D, Seandel M. Enhanced fitness of adult spermatogonial stem cells bearing a paternal age-associated *FGFR2* mutation. *Stem Cell Reports* 2014;3(2):219-26.
- Martínez-García, M. Tesis Doctoral: Caracterización genético-clínica, algoritmos de actuación y consejo genético en pacientes con defectos congénitos de baja prevalencia (cardíacos, craneofaciales, esquelético y/u oculares). Dpto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. 2013.
- Mathiesen JM, Aksglaede L, Skibsted L, Petersen OB, Tabor A; a Danish fetal Medicine Study Group. Outcome of fetuses with short femur length detected at second-trimester anomaly scan: a national survey. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;44(2):160-5.
- McKinlay-Gardner RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counselling. 2004. 3ª Ed. Oxford University Press.
- McKusick VA, Eldridge R, Hostetler JA, Ruangwitt U, Egeland JA. Dwarfism in the Amish. Cartilage-Hair Hypoplasia. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1965;116:285-326.
- Mettler G, Fraser FC. Recurrence risk for sibs of children with "sporadic" achondroplasia. *Am J Med Genet* 2000;90(3):250-1.
- Meyers GA, Orlow SJ, Munro IR, Pzylepa KA, Jabs EW. Fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat Genet* 1995;11(4):462-4.
- Modaff P, Horton VK, Pauli RM. Error in the prenatal diagnosis of children with achondroplasia. *Prenat Diagn* 1996;16(6):525-30.



- Moloney DM, Slaney SF, Oldbridge M, Wall SA; Sahlin P, Stenman G, Wilkie AO. Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome. *Nat Genet* 1996;13(1):48-53.
- Morales-Roselló J, Peralta Llorens N. Outcome of fetuses with diagnosis of isolated short femur in the second half of pregnancy. *ISRN Obstet Gynecol* 2012;2012:268218.
- Moreno-García M, Fernández-Fernández FJ, Barreiro Miranda E. Chromosomal anomalies in patients with short stature. *Pediatr Int* 2005;47(5):546-9.
- Mortier G, Nuytinck L, Craen M, Renard JP, Leroy JG, De Paepe A. Clinical and radiographic features of a family with hypochondroplasia owing to a novel Asn540Ser mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *J Med Genet* 2000;37(3):220-4.
- Moutou C, Rongieres C, Bettahar-Lebugle K, Gardes N, Philippe C, Viville S. Preimplantation genetic diagnosis for achondroplasia: genetics and gynaecological limits and difficulties. *Hum Reprod* 2003;18(3):509-14.
- Muenke M, Gripp KW, McDonald-McGinn DM, Gaudenz K, Whitaker LA, Bartlett SP, Markowitz RI, Robin NH, Nwokoro N, Mulvihill JJ, Losken HW, Mulliken JB, Guttmacher AE, Wilroy RS, Clarke LA, Hollway G, Adès LC, Haan EA, Mulley JC, Cohen MM, Bellus GA, Frncomano CA, Moloney DM, Wall SA, Wilkie AOM, Zackai EH. A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (*FGFR3*) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Hum Genet* 1997;60(3):555-64.
- Mullis KB & Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:355-50.
- Munns CJ, Haese HR, Crowther LM, Hayes MT, Blaschke R, Rappold G, Glass IA, Batch JA. Expression of SHOX in human fetal and childhood growth plate. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(8):4130-5.
- Muñoz-Robles J, Allende LM, Clemente J, Calleja S, Varela P, González L, de Pablos L, de Pablos P, Paz E, Morales P. A novel RMRP mutation in a Spanish patient with cartilage-hair hypoplasia. *Inmunobiology* 2006;211(9):753-7

## n

- Nakashima E, Ikegawa S, Ohashi H, Kimizuka M, Nishimura G. Double-layered patella in multiple epiphyseal dysplasia is not exclusive to DTDST mutation. *Am J Med Genet A* 2005;133A(1):106-7.
- Naski MC, Ornitz DM. FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci* 1998;3:d781-94.
- Natacci F, Baffico M, Cavallari U, Bedeschi MF, Mura I, Paffoni A, Setti PL, Baldi M, Lalatta F. Germline mosaicism in achondroplasia detected in sperm DNA of the father of three affected sibs. *Am J Med Genet A* 2008;146A(4):784-6.
- Nicolosi A, Caruso-Nicoletti M. Epidemiology of SHOX deficiency. *J Endocrinol Invest* 2010;33(6 Suppl):7-10.

Nikkel SM, Major N, King WJ. Growth and development in thanatophoric dysplasia-an update 25 years later. *Clin Vase Rep* 2013;1(2):75-8.

Noel AE, Brown RN. Advances in evaluating the fetal skeleton. *Int J Womens Health* 2014;16:489-500.

Numata S, Hamada T, Teye K, Matsuda M, Ishii N, Karasima T, Kabashima K, Furumura M, Ohata C, Hashimoto T. Complete maternal isodisomy of chromosome 5 in Japanese patient with Netherton syndrome. *J Invest Dermatol* 2014;134(3):849-52.

## O

Oldridge M, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Iseki S, Morriss-Kay GM, Twigg SR, Johnson D, Wall SA, Jiang W, Theda C, Jabs EW, Wilkie AO. De novo alu-element insertions in FGFR2 identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. *Am J Hum Genet* 1999;64(2):446-61.

Orden SSI/2065/2014, de 31 de octubre, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 1030/2006, de 15 de septiembre, por el que se establece la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud y el procedimiento para su actualización. BOE, Núm 269, jueves 6 de noviembre de 2014. Sec.I. Pág.91369.

Orioli M, Castilla EE, Barbosa-Neto GS. The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *J Med Genet* 1986;23(4):328-32.

Orioli M, Castilla EE, Scarano G, Mastroiacovo P. Effecto of paternal age in achondroplasia, thanatophoric dysplasia, and osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet* 1995;59(2):209-17.

Otter M, Schrandt-Stumpel CT, Curfs LM. Triple X syndrome: a review oh the literature. *Eur J Hum Genet* 2010;18(3):265-71.

Ottesen AM, Aksglaede L, Garn I, Tartaglia N, Tassone F, Gravholt CH, Bojesen A, Sørensen K, Jørgensen N, Raipert-De Meyts E, Gerdes T, Lind AM, Kjaergaard S, Juul A. Increased number of sex chromosomes affects height in a nonlinear fashion: a study of 305 patients with sex chromosome aneuploidy. *Am J Med Genet* 2010;152A(5):1206-12.

## P

Papageorgiou AT, Fratelli N, Leslie K, Bhide A, Thilaganathan B. Outcome of fetuses with antenatally diagnosed short femur. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31(5):507-11.

Park WJ, Theda C, Maestri NE, Meyers GA, Fryburg JS, Dufresne C, Cohen MM Jr, Jabs EW. Analysis of phenotypic features and FGFR2 mutations in Apert syndrome. *Am J Hum Genet* 1995;57(2):321-8.

- Parrilla BV, Leeth EA, Kambich MP, Chilis P, MacGregor SN. Antenatal detection of skeletal dysplasias. *J Ultrasound Med* 2003;22(3):255-8.
- Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Sertié AL, Alonso LG, Kitoh H. Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat* 1999;14(2):115-25.
- Pauli RM, Conroy MM, Langer LO Jr, McLone DG, Naidich T, Franciosi R, Ratner IM, Copps SC. Homozygous achondroplasia with survival beyond infancy. *Am J Med Genet* 1983;1684;459-73.
- Paumard-Hernández B, Berges-Soria J, Barroso E, Rivera-Pedroza CI, Pérez-Carrozosa V, Benito-Sanz S, López-Messa E, Santos F, García-Recuero II, Romance A, Ballesta-Martínez JM, López-González V, Campos-Barros A, Cruz J, Guillén-Navarro E, Sánchez del Pozo J, Lapunzina P, García-Miñaur S, Health KE. Expanding the mutation spectrum in 182 Spanish probands with craniosynostosis: identification and characterization of novel TCF12 variants. *Eur J Hum Genet* 2015;23(7):907-14.
- Pazzaglia UE, Donzelli CM, Izzi C, Baldi M, Di Gaetano G, Bonioni M. Thanatophoric Dysplasia. Correlation among bone X-ray morphometry, histopathology, and gene analysis. *Skeletal Radio* 2014;43(9):1205-15.
- Peraita-Ezcurra M, Martínez-García M, Ruiz-Pérez VL, Sánchez Gutiérrez ME, Fenollar-Cortés M, Vélez-Monsalve C, Ramos-Corrales C, Pastor I, Santonja C, Trujillo-Tiebas MJ. Ellis-van Creveld syndrome in a fetus with rhizomelia and polydactyly. Report of a case diagnosed by genetic analysis, and correlation with pathological and radiologic findings. *Gene* 2012;499(1):223-5.
- Pérez-Rodríguez MJ, Anaya-Barea FM, Rosa-García A, Condado Sánchez-Rijas I. Displasia mesomélica de tipo Langer. *An Pediatr (BCN)* 2007;67(6):603-14.
- Philpott CM, Widjaja E, Raybaud C, Branson HM, Kannu P, Blaser S. Temporal and occipital lobe features in children with hypochondroplasia/FGFR3 gene mutation. *Pediatr Radiol* 2013;43(9):1190-5.
- Pombo M, Castro-Feijóo L, Cabanas Rodríguez P. El niño de talla baja. *Protoc Diagn Ter Pediatr* 201;1:236-54.
- Posey KL, Alcorn JL, Hecht JT. Pseudoachondroplasia/COMP-translating from the bench to the bedside. *Matrix Biol* 2014;37:167-73.
- Prinos P, Costa T, Sommer A, Kilpatrick MW, Tsipouras P. A common *FGFR3* gene mutation in hypochondroplasia. *Hum Mol Genet* 1995a;4(11):2097-101.
- Prinos P, Kilpatrick MW, Tsipouras P. A novel G346E *FGFR3* mutation in achondroplasia. 1995b) *Pediatr Res SUPPL* 37:151A.
- Prinster C, Del Naschio M, Beluffi G, Maghie M, Weber G, Del Maschio A, Chiumello G. Diagnosis of hypochondroplasia: the role of radiological interpretation. Italian Study Group for Hypochondroplasia. *Pediatr Radiol* 2001;31(3):203-8.

## R

- Rahemtullah A, McGillivray B, Wilson RD. Suspected skeletal dysplasia: femur length to abdominal circumference ratio can be used in ultrasonographic prediction of fetal outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(4):864-9.
- Ramus RM, Martin LB, Twickler DM. Ultrasonographic prediction of fetal outcome in suspected skeletal dysplasia with use of the femur length-to-abdominal circumference ratio. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179(5):1348-52.
- Ranke MB. Towards a consensus on the definition of idiopathic short stature. *Horm Res* 1996;45(suppl 2):64-6.
- Rannan-Eliya SV, Taylor IB, De Heer IM, Van Den Ouweland AM, Wall SA, Wilkie AO. Paternal origin of FGFR3 mutations in Muenke-type craniosynostosis. *Hum Mutat* 2004;115(3):200-7.
- Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet* 1997;16(1):54-63.
- Rappold G. SHOX; a geneticist's view. *J Clin Endocrinol Metab* 2002a;87(4):1911-2.
- Rappold GA, Fukami M, Niesler B, Schiller S, Zumkeller W, Bettendorf M, Heinrich U, Vlachopapadopoulou E, Reinehr R, Onigata K, Ogata T. Deletions of the homeobox gene shox (short stature homeobox) are an important cause of growth in children with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2002b;87(3):1409-06.
- Rappold G, Blum WF, Shavrikova EP, Crowe BJ, Roeth R, Quigley CA, Ross JL, Niesler B. Genotypes and phenotypes in children with short stature: clinical indicators of SHOX haploinsufficiency. *J Med Genet* 2007;44(5):306-13.
- Rappold GA, Durand C, Decker E, Marchini A, Schneider KU. New roles of SHOX as regulator of target genes. *Pediatr Endocrinol Rev* 2012;9(Suppl 2):733-8.
- REAL DECRETO 1030/2006, de 15 de septiembre, por el que se establece la cartera de servicios comunes del Sistema Nacional de Salud y el procedimiento para su actualización. BOE, núm. 222; sábado 16 septiembre 2006: 32650.
- REAL DECRETO 639/2014, de 25 de julio, por el que se regula la troncalidad, la reespecialización troncal y las áreas de capacitación específica, se establecen las normas aplicables a las pruebas anuales de acceso a plazas de formación y otros aspectos del sistema de formación sanitaria especializada en Ciencias de la Salud y se crean y modifican determinados títulos de especialistas. BOE, núm. 190. Miércoles 6 de agosto de 2014; Sec. I.:Pág 63130
- Ridanpää M, van Eenennaam H, Pelin K, Ghadwick R, Johnson C, Yuan B, van Venrooij W, Pruijn G, Salmela R, Rockas S, Mäkitie O, Kaitila I, de la Chapelle A. Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia. *Cell* 2001;104(2):195-203.

- Ridanpää M, Sistonen P, Rockas S, Rimoin DL, Mäkitie O, Kaitila I. Worldwide mutation spectrum in cartilage-hair hypoplasia: ancient founder origin of the major 70A>G mutation of the untranslated RMRP. *Eur J Hum Genet* 2002;10(7):439-47.
- Rider NL, Morton DH, Puffenberg E, Hendrickson CL, Robinson DL, Strauss KA. Immunologic and clinical features of 25 Amish with RMRP 70 A-->G cartilage hair hypoplasia. *Clin Immunol* 2009; 131(1): 119-28
- Rimoin DL, McKusick VA. Somatic mosaicism in an achondroplastic dwarf. *Birth Defects* 1969;5:17-19.
- Röpke A, Stratis Y, Dossow-Scheele D, Wieacker P, Kliesch S, Tüttelmann F. Mosaicism for an unbalanced Y;21 translocation in an infertile man: a case report. *J Assist Reprod Genet* 2013;30(12):1553-8.
- Ros-Pérez P, Regidor FJ, Colino E, Martínez-Payo C, Barroso E, Health KE. Achondroplasia with 47,XXY karyotype: a case report of the neonatal diagnosis of an extremely unusual association. *BMC Pediatr* 2012;12:88.
- Rosas-Blum E, Shirsat P, Leiner M. Communication genetic information: a difficult challenge for future pediatricians. *BMC Med Educ* 2007;7:17.
- Roscioli T, Elakis G, Cox TC, Moon DJ, Venselaar H, Turner AM, Le T, HackettE, Haan E, Colley A, Mowat D, Worgan L, Kirk EP, Sachdev R, Thompson E, Gabbett M, McGaughan J, Gibson K, Gattas M, Freckmann ML, Dixon J, Hoefsloot L, Field M, Hackett A, Kamien B, Edwards M, Adès LC, Collins FA, Wilson MJ, Savarirayan R, Tan TY, Amor DJ, McGilivray G, White SM, Glass IA, David DJ, Anderson PJ, Gianoutsos M, Buckley MF. Genotype and clinical care correlations in craniosynostosis: findings from a cohort of 630 Australian and New Zeland patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2013;163C(4):259-70.
- Ross JL, Scott C Jr, Marttila P, Kowal K, Nass A, Papenhausen P, Abboudi J, Osterman L, Kushner H, Carter P, Ezaki M, Elder F, Wei F, Chen H, Zinn AR: Phenotypes associated with SHOX deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(12):5674-80.
- Rossi A, Superti-Furga A. Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporte (DTDST) gene (SLC26A2): 22 novel mutations, mutation review, associated skeletal phenotypes, and diagnostic revelance. *Hum Mutat* 2001;18(1):82.
- Rossodivita A, Colabucci F. Shorta stature in a patient with Klinefelter syndrome and growth hormone deficiency. *Am J Med Genet* 1994;49(2):244-6,
- Rousseau F, Saugier P, Le Merrer M, Munnich A, Delezoide AL, Maroteaux P, Bonaventure J, Narcy F, Sanak M. Stop codon *FGFR3* mutations in thanatophoric dwarfism type 1. *Nat Genet* 1995;10(1):11-2.
- Rousseau F, el Cghouzzi V, Delezoide AL, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, Bonaventure J. Missense *FGFR3* mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1). *Hum Mol Genet* 1996;5(4):509-12.
- Rousseau F, Bonaventure J, Legali-Mallet L, Schmidt H, Weissenbach J, Maroteaux P, Munnich A, Le Merrer M. Clinical and genetic heterogeneity of hypochondroplasia. *J Med Genet* 1996;33(9):749-52.

Rump P, Letteboer TG, Gille JJ, Torringa MJ, Baerts W, van Gestel JP, Verheij JB, van Essen AJ. Severe complications in a child with achondroplasia and two FGFR3 mutations on the same allele. *Am J Med Genet A* 2006;140(3):384-90.

## S

Sabherwal N, Blaschke RJ, Marchini A, Heine-Suner D, Rossell J, Ferragut J, Blum WF, Rappold G. A novel point mutation A170P in the SHOX gene defines impaired nuclear translocation as a molecular cause for Léri-Weill dyschondrosteosis and Langer dysplasia. *J Med Genet* 2004a;41(6):e83.

Sabherwal N, Scheneider KU, Blaschke RJ, Marchini A, Rappold G. Impairment of SHOX nuclear localization as a cause for Léri-Weill syndrome. *J Cell Sci* 2004b;117(Pt 14):3041-8.

Saito H, Sekzawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000;256(9236):1170.

Saito T, Nagasaki K, Nishimura G, Takagi M, Hasegawa T, Uchiyama M. Radiological clues to the early diagnosis of hypochondroplasia in the neonatal period: report of two patients. *Am J Med Genet A* 2012;158(3):630-4.

Saiki RKR, Scharf SS, Faloona FF, Mullis KBK, Horn GTG, Erlich HAH, Arnheim NN. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(1732):1350-4.

Salomon LJ, Bernard JP, Nizard J, Ville Y. First-trimester screening for fetal triploidy at 11 to 14 weeks: a role for fetal biometry. *Prenatal Diagn* 2005;25(6):479-83.

Sanlaville D, Vialard F, Thépot F, Vue-Droy L, Ardalán A, Nizard P, Corré A, Devauchelle B, Martin-Denavit R, Nouchy M, Malan V, Taillemite JL, Portnoï MF. Functional disomy of Xp including duplication of DAX1 gene with sex reversal due to t(X;Y) (p21.2;p11.3). *Am J Med Genet A* 2004;128A(3):325-30.

Santos HG, Alemida M, Fernandes H, Wilkie AO. Clinical hypochondroplasia in a family caused by heterozygous double mutation in *FGFR3* encoding Gly380Lys. *Am J Med Genet A* 2007;143(4):355-9.

Sanz Marcos N, Turón Viñas A, Ibáñez Toda L. Atypical presentation of klinefelter syndrome. *An Pediatr (Barc)* 2013;79(2):112-5.

Schramm T, Gloning KP, Menderer S, Daumer-Haas C, Hörtnagel K, Nerlich A, Tutschek B. Prenatal sonographic diagnosis of skeletal dysplasias. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;34(2):160-70.

Schindler S, Friedrich M, Wagener H, Lorenz B, Preising MN. Heterozygous P250L mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in a case of isolated craniosynostosis. *J Med Genet* 2002;39(10):764-6.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30(12):e57.

- Seal JL, Gornick MC, Gogtay N, Shaw P, Greenstein DK, Coffey M, Gochman PA, Stromberg T, Chen Z, Merriman B, Nelson SF, Brooks J, Arepalli S, Wavrant-De Vrièze F, Hardy J, Rapoport JL, Addington AM. Segmental uniparental isodisomy on 5q32-qter in a patient with childhood-onset schizophrenia. *J Med Genet* 2006;43(11):887-92.
- Seaver LH, Irons MI. ACMG practice guideline: genetic evaluation of short stature. *Genet Med* 2009;11(6):465-70.
- Seki A, Jinno T, Suzuki E, Takayama S, Ogata T, Fukami M. Skeletal deformity associated with SHOX deficiency. *Clin Pediatr Endocrinol* 2014;23(3):65-72.
- Shears DJ, Vassal HJ, Goodman FR, Palmer RW, Reardon W, Superti-Furga A, Scambler PJ, Winter RM. Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. *Nat Genet* 1998;19(1):70-3.
- Shiang T, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, Winokur ST, Wasmuth JJ. Mutations in the transmembrane domain of *FGFR3* cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 1994;78(2):335-42.
- Slaney SF, Oldridge M, Husrt JA, Moriss-Kay GM, Hall CM, Poole MD, Wilkie AO. Differential effects of *FGFR2* mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. *Am J Hum Genet* 1996;58(5):923-32.
- Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO). Diagnóstico prenatal de los defectos congénitos. Cribado de anomalías cromosómicas. ProSEGO: Protocolos y Guías de Actuación Clínica en Ginecología y Obstetricia. Enero, 2012.
- Song SH, Balce GCE, Agashe MV, Lee H, Hong SJ, Park YE, Dim SG, Song HR. New proposed clinico-radiologic and molecular criteria in hypochondroplasia: *FGFR3* gene mutations are not the only cause of hypochondroplasia. *Am J Med Genet Part A* 2012;158A:2456-62.
- Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang D, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* 1994;79(6):1015-24.
- Spranger JW, Brill PW, Poznanski A. Achondroplasia. En: Bone dysplasias. An atlas of genetic disorders of skeletal development. Second Ed. Oxford University Press. 2002.
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* 2003;21(6):577-81.
- Stoll C, Dott B, Roth MP, Alembik Y. Birth prevalence of skeletal dysplasia. *Clin Genet* 1989;35(2):88-92.
- Strom CM, Verlinsky Y, Milayeva S, Evskiov S, Cieslak J, Lifchez A, Valle J, Moise J, Ginsberg N, Applebaum M. Preconception genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet* 1990;336(8710):306-7.
- Stuppia L, Gatta V, Antonucci I, Giuliani R, Palka G. Different approaches in the molecular analysis of the SHOX gene dysfunctions. *J Endocrinol Invest* 2010;33(6 Suppl):30-3.



- Superti-Furga A, Eich G, Bucher HU, Wisser J, Giedion A, Gitzelmann R, Steinmann B. A glycine 375-to-cysteine substitution in the transmembrane domain of the fibroblast growth factor receptor-3 in a newborn with acondroplasia. *Eur J Pediatr* 1995;154(3):215-9.
- Superti-Furga A, Neumann L, Riebel T, Eich G, Steinmann B, Spranger J, Kunze J. Recessively inherited multiple epiphyseal dysplasia with normal stature, club foot, and double layered patella caused by a DTDST mutation. *J Med Genet* 1999;36(8):621-4.
- Superti-Furga A, Bonafé L, Rimoin D. Molecular-Pathogenic classification of genetic disorders of the skeleton. *Am J Med Genet* 2001;106(4):282-93.
- Sulisalo T, Sistonen P, Hastbacka J, Wadelius C, Mäkitie O, de la Chapelle A, Kaitila I. Cartilage-hair hypoplasia gene assigned to chromosome 9 by linkage analysis. *Nature Genetics* 1993;3(4):338-341.
- Sulisalo T, Klockars J, Mäkitie O, Francomano CA, de la Chapelle A, Kaitila I, Sistonen P. High-resolution linkage-desequilibrium mapping of the cartilage-hair hypoplasia gene. *Am J Hum Genet* 1994a;55(5):937-945.
- Sulisalo T, Francomano CA, Sistonen P, Maher JF, McKusick VA, de la Chapelle A, Kaitila I. High-resolution genetic mapping of the cartilage-hair hypoplasia (CHH) gene in Amish and Finnish families. *Genomics* 1994b;20(3):347-353.

## t

- Taskinen M, Ranki A, Pukkala E, Jalkanen L, Kaitila I, Mäkitie O. Extended follow-up of the Finnish cartilage-hair hypoplasia cohort confirms high incidence of non-Hodgkin lymphoma and basal cell carcinoma. *Am J Hum Genet* 2008;146A(18):2370-5.
- Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Wilkin DJ, Lachman RS, Wilcox WR, Rimoin DL, Cohn DH, Wasmuth JJ. Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1995a;9(3):321-8.
- Tavormina PL, Rimoin DL, Cohn DH, Zhu YZ, Shiang R, Wasmuth JJ. Another mutation that results in the substitution of an unpaired cysteine residue in the extracellular domain of FGFR3 in thanatophoric dysplasia type I. *Hum Mol Genet* 1995b;4(11):2175-7.
- Tavormina PL, Bellus GA, Webster MK, Bamshad MJ, Fraley AE, McIntosh I, Szabo J, Jiang W, Jabs EW, Wilcox WR, Wasmuth JJ, Donoghue DJ, Thompson LM, Francomano CA. A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys 650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *Am J Hum Genet* 1999;64(3):722-31.
- Taybi H, Lachmann RS. En: Radiology of syndromes, metabolic disorders, and skeletal dysplasias, 4th edn. 1996 Mosby, St Louis, pp 939-945.
- Thauvin-Robinet C, Faivre L, Lewin P, De Monléon JV, François C, Huet F, Couailler JF, Campos-Xavier AB, Bonaventure J, Le Merrer M. Hypochondroplasia and stature



within normal limits: another family with an Asn540Ser mutation in the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. *Am J Med Genet A* 2003;119A(1):81-4.

Thiel CT, Horn D, Zabel B, Ekici AB, Salinas K, Gebhart E, Rüschenhoff F, Sticht H, Spranger J, Müller D, Zweier C, Schmitt ME, Reis A, Rauch A. Severely uncoupling mutations in patients with extreme short stature identify RNA-processing endonuclease *RMRP* as essential cell growth regulator. *Am J Hum Genet* 2005;77(5):795-806.

Thiel CT, Mortier G, Kaitila I, Reis A, Rauch A. Type and level of *RMRP* functional impairment predicts phenotype in the cartilage hair hypoplasia-Anaeretic Dysplasia spectrum. *Am J Hum Genet* 2007;81(3):519-529.

Thiel CT, Rauch A. The molecular basis of the cartilage-hair hypoplasia-anaeretic dysplasia spectrum. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(1):131-42.

Thomas NS, Harvey JF, Bunyan DJ, Rankin J, Grigoriou G, Bruno DL, Tan TY, Tomkins S, Hastings R. Clinical and molecular characterization of duplications encompassing the human *SHOX* gene reveal a variable effect on stature. *Am J Med Genet A* 2009;149A(7): 1407-14.

Todros T, Massarenti U, Gaglioti P, Biolcati M, Borra G, De Felice C. Fetal short femur length in the second trimester and the outcome of pregnancy. *BJOG* 2004;111(1):83-5.

Trujillo-Tiebas MJ, Riveiro R, Queipo A, VallesPín E, Cantalapiedra D, Lorda-Sánchez I, Ayuso C. Gene Symbol: *FGFR3*. Disease: Skeletal Dysplasia. *Hum Genet* 2004;115(4):348.

Trujillo-Tiebas MJ, Fenollar-Cortés M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Carrillo Redondo A, Ramos-Corrales C, Ayuso C. Prenatal diagnosis of skeletal dysplasia due to *FGFR3* mutations: a 9-year experience, prenatal diagnosis in *FGFR3* gene. *J Assist Reprod Genet* 2009;26(8):455-60.

## U

Unger SL, Bonafé L, Superti-Furga A. Multiple epiphyseal dysplasia: clinical and radiographic features, differential diagnosis and molecular basis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22(1):19-32.

## V

Vajo Z, Francomano CA, Wilkin DJ. The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev* 2000;21(1):23-39.

van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boevé ER, Jöbsis AC, Zwarthoff EC. *FGFR3* and *p53* characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res* 2004;64(6):1911-4.

Vatanavicharn N, Lachman RS, Rimoin DL. Multilayered patella: similar radiographic findings in pseudoachondroplasia and recessive multiple epiphyseal dysplasia. *Am J Med Genet A* 2008;146A(13):1682-6.

Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1990;5(8):826-9.

Vermeer N, Bekker MN. Association of isolated short fetal femur with intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn* 2013;33(4):365-70.

## W

Wallenstein MB, Harper LM, Odibo AO, Roehl KA, Longman RE, Macones GA, Cahill AG. Fetal congenital heart disease and intrauterine growth restriction: a retrospective cohort study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25(6):662-5.

Wang H, Sun Y, Wu W, Wei X, Lan Z, Xie J. A novel missense mutation of *FGFR3* in a Chinese female and her fetus with Hypochondroplasia by next-generation sequencing. *Clin Chim Acta*. 2013;423:62-5.

Wang JC, Ross L; Mahon LW, Owner R, Hemmat M, Wang BT, El Naggar M, Kopita KA; Randolph LM, Chase JM, Matas Aguilera MJ, Siles JL, Church JA, Hauser N, Shen JJ, Jones MC, Wierenga KJ, Jiang Z, Haddadin M, Boyar FZ, Anguiano A, Strom CM, Sahoo T. Regions of homozygosity identified by oligonucleotide SNP arrays: evaluating in the incidence and clinical utility. *Eur J Hum Genet* 2015;23(5): 663-71.

Wapner RJ, Sorokin Y, Thom EA, Johnson F, Dudley DJ, Spong CY, Peaceman AM, Leveno KJ, Harper M, Caritis SN, Miodovnik M, Mercer B, Thorp JM, Moawad A, O'Sullivan MJ, Ramin S, Carpenter MW, Rouse DJ, Sibai B, Gabbe SG; National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Units Network. Single versus weekly courses of antenatal corticosteroids: evaluation of safety and efficacy. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195(3):633-42.

Warburton D. De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am j Hum Genet* 1991;49(5):995-1013.

Warman ML, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Lachman R, LeMerrer M, Mortier G, Mundlos S, Nishimura G, Rimoin DL, Robertson S, Savarirayan R, Sillence D, Spranger J, Unger S, Zabel B, Superti-Furga A. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision. *Am J Med Genet A* 2011;155A(5):943-68.

Weldner BM, Persson PH, Ivarsson SA. Prenatal diagnosis of dwarfism by ultrasound screening. *Arch Dis Child* 1985;60(11):1070-2.

Wellesley D, Dolk H, Boyd PA, Greenlees R, Haeusler M, Nelen V, Garne E, Khoshnood B, Doray B, Rissmann A, Mullaney C, Calzolari E, Bakker M, Salvador J, Addor MC, Draper E, Rankin J, Tucker D. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *Eur J Hum Genet* 2012;20(5):521-26.

- Welting T, Van Venrooij W, Pruijn G. Mutual interactions between subunits of the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Research* 2004;32(7):2138-2146.
- Wilcox WR, Tavormina PL, Krakow D, Kitch H, Lachman RS, Wasmuth JJ, Thompson LM, Rimoin DL. Molecular, radiologic, and histopathologic correlations in thanatophoric dysplasia. *Am J Med Genet* 1998;78(3):274-81.
- Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD, Hayqard RD, David DJ, Pulleyn LJ, Rutland P, Malcom S, Winter RM, Reardon W. Apert syndrome results from localized mutations of *FGFR2* and is allelic with Crouzon Syndrome. *Nat Genet* 1995;9(2):165-72.
- Wilkie AO. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(2):187-203.
- Wilkin DJ, Szabo JK, Carmeron R, Henderson S, Bellus GA, Mack ML, Kaitila I, Loughlin J, Munnich A, Sykes B, Bonaventure J, Francomano CA. Mutations in fibroblast growth-factor receptor 3 in sporadic cases of achondroplasia occur exclusively on the paternally derived chromosome. *Am J Hum Genet* 1998;63(3):711-6.
- Winter, TC, Kennedy AM, Byrne JL, Woodward PJ. An automated process for calculating long bone deviations in fetuses with suspected skeletal dysplasia. *J Ultrasound Med* 2012;31(7):1140-1.
- Winterpacht A, Hilbert K, Steizer C, Schweikardt T, Decker H, Segerer H, Spranger J, Zabel B. A novel mutation in *FGFR3* disrupts a putative N-glycosylation site and results in hypochondroplasia. *Physiol Genomics* 2000;2(1):9-12.
- Wit JM, Clayton PE, Togol AD, Savage MO; Saenger PH, Cohen P. Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Growth Horm IGF Res* 2008;18(2):89-110.
- Wit JM, Kiess W, Mullis P. Genetic evaluation of short stature. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(1):1-17.
- Wolters B, Lass N, Winsch R, Böckmann B, Austrup F, Reinehr T. Short stature before puberty: which children should be screened for SHOX deficiency? *Horm Res Paediatr* 2013;80(4):273-80.
- Wooding HC, Boehm K, Thompson RE, Hadley D, Francomano CA, Biesecker B. Issues surrounding prenatal genetic testing for achondroplasia. *Prenat Diagn* 2002;22(10):933-40.

## X

- Xue Y, Sun A, Mekikian PB, Martin J, Rimoin DL, Lachman RS, Wilcox WR. FGFR3 mutation frequency in 324 cases from the International Skeletal Dysplasia Registry. *Mol Genet Genomic Med*. 2014;2(6):497-503.

## y

- Yadav S, Dabas A. Approach to short stature. *Indian J Pediatr* 2015;82(5):462-70.
- Yamada T, Sawai H, Nishimura G, Numabe H, Cho K, Minakami H. Platyspondylic lethal skeletal dysplasia San Diego Type (thanatophoric dysplasia type 1) associated with trisomy 21 presenting with nuchal translucency: a case report. *Prenat Diagn* 2009;29(7):715-7.
- Yaron Y, Ochshorn Y, Tsabari S, Shira AB. First-trimester nuchal translucency and maternal serum free beta-hCG and PAPP-A can detect triploidy and determine the parental origin. *Prenat Diagn* 2004;24(6):445-50.
- Yeh P, Saeed F, Paramasivam G, Wyatt-Ashmead J, Kumar S. Accuracy of prenatal diagnosis and prediction of lethality of fetal skeletal dysplasias. *Prenat Diagn* 2011;31(5):515-8.

## z

- Zechi-Ceide RM, Moura PP, Raskin S, Richieri-Costa A, Guion-Almeida ML. A compound heterozygous SLC26A2 mutation resulting in robin sequence, mild limbs shortness, accelerated carpal ossification, and multiple epiphyseal dysplasia in two Brazilian sisters. A new intermediate phenotype between diastrophic dysplasia and recessive multiple epiphyseal dysplasia. *Am J Med Genet A* 2013;161A(8):2088-94.
- Zhang SR, Zhou XQ, Ren X, Wang TT, Yuan MX, Wang Q, Liu JY, Liu MG. Ser217Cys mutation in the IgII domain of FGFR3 in a Chinese family with autosomal dominant achondroplasia. *Chin Med J (Engl)* 2007;120(11):10147-9.
- Zhong Q, Layman LC. Genetic considerations in the patient with Turner syndrome—45,X with or without mosaicism. *Fertil Steril* 2012 98(4):445-9.
- Zhu B, Dong QM, Huang XH, Ji GQ, Chen Y, Wang WX, Jiang HY, Gao JS. [Mutation analysis of fibroblast growth factor receptor 3 gene in an achondroplasia family]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2003;20(5):373-5. Artículo en chino.
- Zinn AR, Wei F, Zhang L, Elder FF, Scott CI Jr, Marttila P, Ross JL. Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet* 2002;110(s):156-63.

## **8. artículos publicados relacionados con la tesis**



# Prenatal diagnosis of skeletal dysplasia due to *FGFR3* gene mutations: a 9-year experience

## Prenatal diagnosis in *FGFR3* gene

M. J. Trujillo-Tiebas · M. Fenollar-Cortés ·  
I. Lorda-Sánchez · J. Díaz-Recasens ·  
A. Carrillo Redondo · C. Ramos-Corrales · C. Ayuso

Received: 25 May 2009 / Accepted: 21 August 2009 / Published online: 30 September 2009  
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

### Abstract

**Purpose** Prenatal diagnosis with ultrasound findings compatible with skeletal dysplasia due to *FGFR3* mutations over a 9 year period in pregnancies and abortuses.

**Methods** 54 samples were studied. Aneuploidy studies were carried out on all samples. By sequencing analysis, we determined mutations for achondroplasia (ACH), hypochondroplasia (HCH), and type I and type II thanatophoric dysplasia (TD). **Results** 2 chorionic villi samples had a G380R mutation due to a mother with ACH; 4 amniotic fluid samples with TDs in which the foetuses had micromelia plus hypoplastic thoraces; 5 samples from abortuses with TDs. Neither ACH nor HCH occurred in sporadic cases.

**Conclusions** Molecular studies in ongoing pregnancies are indicated in cases with an affected parent, a family history

with positive molecular studies (maternal anxiety), and when the US finding demonstrates micromelia with a hypoplastic thorax. A protocol for tissues of abortuses should include an X-ray, pathologic anatomy, and genetic studies.

**Keywords** *FGFR3* gene · Prenatal diagnosis · Skeletal dysplasias · Ultrasound finding

### Introduction

In 1988, Spranger classified hypochondroplasia (HCH), achondroplasia (ACH), and thanatophoric dysplasias (TD-I and TD-II) as the same family of dysplasias within the group of pathologies that are denominated generically as skeletal dysplasias [1]. All of the dysplasias display common phenotypic characteristics with different grades of severity.

The clinical observations of Spranger were subsequently confirmed. The fibroblast growth factor receptor 3 gene (*FGFR3*) is a transmembrane tyrosine kinase receptor that binds fibroblast growth factors (FGFs). The gene, isolated in 1991, is located on chromosome 4 (4p16.3) and is comprised of 19 exons and 18 introns [2, 3]. The codified protein consists of 840 amino acids and presents a highly conserved structure that is very similar to the rest of the proteins that compose the family of fibroblast growth factor receptors (FGFR-1, -2, and -4). Mutations associated with HCH, ACH, and TD are gain-of-function mutations causing ligand-independent activation of *FGFR3*. This generates a shortening of the long bones and abnormal differentiation of other bones [4]. All of the mutations are inherited in a dominant pattern.

TDs are the most frequent sporadic lethal skeletal dysplasias (OMIM:187600), with an incidence of 1–3:60000 [5, 6]. The physical characteristics of TDs include markedly

**Capsule** Molecular cytogenetic studies are indicated and complementary to ultrasound in familial cases involving mutations in the *FGFR3* gene.

Trujillo-Tiebas and Fenollar-Cortés contributed equally to this work.

M. J. Trujillo-Tiebas · I. Lorda-Sánchez · A. Carrillo Redondo ·  
C. Ramos-Corrales · C. Ayuso  
Department of Genetics, Fundación Jiménez Díaz (CIBERER),  
Madrid, Spain

M. Fenollar-Cortés (✉)  
Departamento de Genética, Servicio de Análisis Clínicos,  
Hospital Clínicos San Carlos, C/ Prof Martín Lagos s/n,  
Madrid 28040, Spain  
e-mail: mfenollar.hcsc@salud.madrid.org

M. Fenollar-Cortés  
Predoctoral fellow in Fundación Jiménez Díaz,  
Madrid, Spain

J. Díaz-Recasens  
Department of Gynecology, Fundación Jiménez Díaz,  
Madrid, Spain

shortened limbs, macrocephaly, platyspondily, and a narrow thoracic cage with short ribs. Individuals usually die after birth from respiratory distress secondary to pulmonary hypoplasia. Two phenotypes have been distinguished: 1) the above-described clinical signs plus curved femurs (TD-I) or 2) the less frequent, straight femurs and a cloverleaf skull (TD-II). There are several mutations described in TD-I that result from either a stop or missense mutation in different codons (mainly codons 248, 650, and 807), but in TD-II an exclusive mutation (Lys650Glu) has been associated with this phenotype [4, 7, 8].

Achondroplasia (ACH; OMIM: 100800) is the most common type of human dwarfism, with an incidence between 1 in 10,000 and 1 in 30,000 live births [5, 6, 9]. ACH is characterized mainly by disproportionate short stature, macrocephaly, spinal stenosis, brachidactyly, and three-pronged fingers (trident). Greater than 90% of the cases are sporadic and are strongly associated with paternal age [4, 10, 11]. The first mutation described in the *FGFR3* gene was at codon 380 (G>A transition at nucleotide 1138). This transition is observed in 95% of affected patients [12–14]. In the same nucleotide, another change was identified as a G>C transversion [13]. Both mutations result in the substitution of an arginine amino acid for a glycine at codon 380 that is located in the transmembrane domain of the protein.

HCH is characterized by short stature, micromelia, and lumbar lordosis (OMIM: 14600). The phenotype is similar, but milder compared to ACH. Mutations are more widespread in *FGFR3* with a hotspot in the tyrosine kinase domain at codon 540 in exon 13, in which diverse mutations have been detected [15]. Codons 538 and 650 have been implicated in this pathology as well. However, only 70% of clinically diagnosed patients have a known mutation and there are reported familial cases not linked to chromosome 4 that supports a clinically and genetically heterogeneous condition [4, 16].

Accurate prenatal diagnosis of skeletal dysplasias based only on ultrasonographic (US) and radiographic results is feasible only for the lethal types [17] and most of them are detected in advanced pregnancy. The introduction of molecular analysis has played an important role for accurate diagnosis in the uterus.

The aim of the present study was to report on our experience over 9 years in *FGFR3* molecular prenatal diagnosis with suspicion of skeletal dysplasias. In addition, we wanted to define a protocol for best practice on gravidas with a US-positive finding and abortuses with phenotypes compatible with skeletal dysplasia.

## Materials and methods

Fifty-four prenatal samples were referred to the Laboratory of Genetics for molecular analysis of the *FGFR3* gene with

the diagnosis of a skeletal dysplasia or a specific dysplasia (HCH/ACH) from different Spanish Hospitals over 9 years. Nineteen samples were from chorionic villi at 10–19 weeks gestation (CVS, 35%); 15 amniotic fluid samples at 13–35 weeks (AF, 28%), and 20 were samples from abortuses at 12–23 weeks gestation (TA, 37%). In addition, six parental samples were requested to identify the mutation in affected parents with an ACH or HCH phenotype. Samples had been provided to the Department of Genetics since 1999 by public and private clinics to confirm a skeletal dysplasia phenotype. The invasive technique after week 15, transabdominal chorionic villus biopsy or amniocentesis, was decided by the gynecologist depends on echographic parameters and amount of DNA test needs. Since 2002, our laboratory has been certificated by the European Molecular Quality Network (EMQN).

Of the 19 CVS samples, the indications were as follows: i) US finding of skeletal dysplasia (marked micromelia or lethal skeletal dysplasia) in an ongoing pregnancy in 5 samples between 15–20 weeks gestation; ii) previous fetal ACH diagnosis by US, but not tested by molecular studies in 7 samples; and iii) an affected familial member with positive molecular studies in 7 cases (4 maternal ACH, 2 offspring ACH, and 1 fetal TD-I).

From 15 AF samples, i) 13 were referred because of alteration during a routine US examination (short limbs were the most frequent finding) and 4 had a narrow chest and micromelia; and ii) 2 were referred because of a male sibling with ACH and a previous fetal ACH diagnosis by US, but not tested by molecular studies.

From 20 TA samples, indications were skeletal dysplasia in 16 cases, TD in 2 cases, and ACH in the remaining 2 cases.

## Molecular studies

Genomic DNA was extracted from lymphocytes, TA, AF, and CVS with BioRobot EZ1 (QUIAGEN, Germany), with DNA-blood, DNA-tissue, or forensic cards and reagents of blood or tissue according to the sample (DNA Blood 350µl extraction Kit; Tissue Kit).

Chromosomal abnormalities were ruled out by cytogenetic or molecular studies in all cases. Two Multiplex QF-PCR assays with STR markers for chromosomes 13, 15, 18, and X were performed for the study of aneuploidies [18].

Sequencing analysis was chosen as the technique for molecular analysis of mutations because it generates more information and therefore allows a diagnosis based on a more complete molecular study. Analysis of all the mutations associated with the *FGFR3* gene is advisable, so we made five PCR reactions in the study routine, starting with the mutation which the phenotype suggested. Primer pairs used to amplify part of exons 6, 7, 10, 13–16, and 19 are available in Table 1 [7, 13, 15]. Five PCR reactions were performed in



**Table 1** Sequences of primer pairs used to amplify exons 7, 10, 13–16, and 19

Primers	Length (pb)	Codon	Exon	Ta
5'GTCGTGGAGAACAAGTTTG3' 5'GCAAGGTGTACAGTGACGCA3'	158	<b>TD-I:</b> 248, 249	7	58°C
5'AGGAGCTGGTGGAGGCTG3' 5'CCACCGTGCACAAGATCTCC3'	224	<b>TD-I:</b> 370, 371, 373 <b>ACH:</b> 375, 380, 394	10	65°C
5'ACTGACAAGGACCTGTCGGACC3' 5'GACTACTCCTTCGACACCTGCAA3'	146	<b>HCH:</b> 538, 540	14	66°C
5'GACCGAGGACAACGTGATGAAGAT3' 5'CCTTGTTTGACCGAGTCTACACTC3'	143	<b>TD-I, TD-II, HCH:</b> 650	15	65°C
5'CCTGTCGGCGCCTTTTCGAGCAGTAC3' 5'CTAGCAGCCCACCCTGCTGCTGGTG3'	194	<b>TD-I:</b> 807	19	70°C

Ta: temperature annealing

a 50 µL reaction volume containing 10 µM of each primer, 200 µM dNTPs, 10X FastStart Taq DNA polymerase buffer (15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>; Applied Biosystems, USA), GC-RICH solution 5X (Roche), and 0.5 U/µL of FastStart Taq DNA polymerase (Applied Biosystems, USA). A 100 ng aliquot of genomic DNA was denatured for 10 min at 95°C followed by 35 cycles of amplification (30 sec at 95°C, 30 sec at different Annealing (Table 1), and 45 sec at 72°C), followed by a 10 min extension at 72°C. PCR products were directly sequenced using the Big Dye Sequencing kit (Applied Biosystems, USA) on an ABIPRISM 3130 Genetic Analyzer and analysed with the Sequencing 5.2 software package (Applied Biosystems).

## Results

Eleven of the 54 samples were found to carry a mutation on the *FGFR3* gene (Table 2). Only 2 CVS samples were positive and both because of a maternal ACH. In the AF samples, just as in the four cases with a hypoplastic thorax plus micromelia were detected, there was a positive molecular test, as follows: 3 cases of TD-I (2 with a 742C>T [R248C] mutation and 1 with a 1118A>G [Y373C] mutation) and 1

case of TD-II (1948A>G [K650E] mutation). In another four AF samples with negative *FGFR3* results, another pathology was diagnosed later: i) polycystic kidneys, ii) short rib polydactyly syndrome, iii) a neonate with a cardiovascular malformation and cleft palate; and iv) a probable intrauterine growth retardation secondary to corticoid treatment in a mother with systemic lupus erythematosus [19].

Five mutations were identified in samples from abortuses: 2 TD-I and 3 TD-II. Figure 1 shows an X-ray of two of the samples with the most characteristic signs. Four samples were not able to be studied due to degraded DNA, but pathologic studies of one of the samples indicated a probable 18 trisomy. One sample from an abortus was a 69,XXY triploidy. A non-reported T-to-C change at 1150 nucleotide (F384L) of the *FGFR3* gene was found in other sample from an abortus. The father carried out the same change without any suggested clinical criteria [20]. We propose these polymorphisms/mutations as an additive pathologic effect in the receptor in combination with other changes in the same or other family member receptor of FGF, but further studies are necessary to confirm the hypothesis suggested.

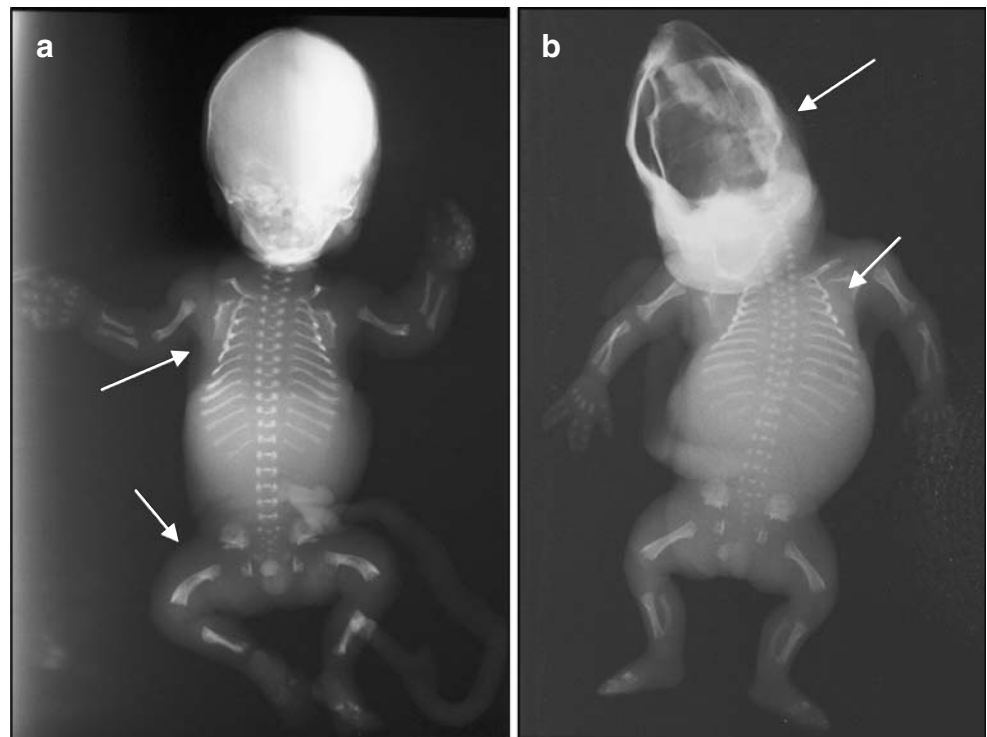
Four of the 6 parental samples were carried out for the G380R ACH mutation. Two were necessary for checking the 384 polymorphic mutations.

**Table 2** Mutations on the *FGFR3* gene

	CVS			AF			TA	
	USOP	PMS-	AFMS+	USOP	PMS-	AFMS+		TOTAL
	5	7	7	13	2	0	20	
TD-I	0	0	0	3	0	0	2	5
TD-II	0	0	0	1	0	0	3	4
ACH	0	0	2	0	0	0	0	2
	2/19 (11%)			4/15 (27%)			5/20 (25%)	11/54 (20%)

CVS: chorionic villi samples. AF: amniotic fluid samples. TA: tissue of abortion. USOP: US finding of skeletal dysplasia in an ongoing pregnancy. PMS-: previous fetal ACH diagnosis by US, but not tested by molecular studies. AFMS+: an affected familial member with positive molecular studies.

**Fig. 1** Anteroposterior postmortem plain X-ray of two thanatophoric dysplasia affected fetuses: **a** Type I with hypoplastic thorax with shorts ribs, markedly shortened limbs with curved femurs and normal skull (at 23 weeks gestation). **b** Type II with hypoplastic thorax with shorts ribs, markedly shortened limbs with straight femurs and a cloverleaf skull (at 22 weeks gestation)



## Conclusions

In *FGFR3* molecular prenatal diagnosis, biopsy of the chorionic villi was indicated in cases in which a parent was affected with ACH/HCH. In those cases with a positive molecular study of skeletal dysplasia due to *FGFR3* mutations in a previous pregnancy or in an affected son, a prenatal diagnosis in a following pregnancy may be done for anxiety since germ line mosaicisms must be very rare and have not been reported [21]. In our 19 CVS group, only 7 cases were really indicated for molecular study because there was a positive familial case. Four ACH gravidas, verified by blood samples, were referred for prenatal diagnosis. Two fetuses were positive. The other two lost their fetuses after a difficult transcervical chorionic villus biopsy, both with a negative result. Given their skeletal malformations, the biopsy of chorionic villi is not always feasible and must be considered other invasive technique for prenatal diagnosis. In the study by Gooding *et al.* about prenatal genetic testing for ACH in affected parents, just 38% were interested in the parentally diagnosis of ACH, but participants were not willing to consider termination of pregnancy based on the diagnosis (86%). They were most interested in avoiding the lethal form of ACH (homozygous) when both parents were affected [22]. So it is important to give suitable genetic counselling to choose which invasive technique for prenatal diagnosis is better for the particular case, bearing in mind the psychological impact and the risk of losing the fetus. The current techniques of DNA extraction and the more sensitivity of the molecular tests allows to work

with less DNA concentration so direct AF sample could be a candidate for molecular studies instead of CVS.

The prenatal ultrasonography allows the detection of skeletal dysplasias, but most of them appear in the second trimester or later when the legal termination of pregnancy (TOP) is not possible (until 22 weeks in Spain for foetal anomalies). Accurate prenatal diagnosis of skeletal dysplasias based only on sonographic results is feasible just for the lethal types and can be detected between the 20 and 24 weeks gestation [23–25]. Parrilla *et al.* reported the ratio of femur length-to-abdominal circumference  $<0.16$  with a hypoplastic thorax as indicative of a lethal skeletal dysplasia [17]. In our AF series, micromelia was the most frequent finding by US examination for offering a molecular diagnosis. Just the 4 fetuses which showed short limbs with hypoplastic thorax were positive for a lethal skeletal dysplasia (27%). In 5 CVS cases marked micromelia, with [2] or without [3] a lethal skeletal dysplasia, was the main sign for offering a molecular diagnosis (15 and 20 weeks of gestation). All cases were negative. In the study by Todros *et al.* about the dilemma of the detection of a shortening of femur length (FL), they reported 86 fetuses with a FL below the 10th percentile measured between 15–24 weeks of gestational age, from 1028 pregnant women. There were 28 normal, 18 small-for-gestational age babies and 40 structurally abnormal. Of the 40 malformed fetuses, 16 had chromosomal disorders, 13 had skeletal dysplasias (4 TD, 4 ACH, 1 osteogenesis imperfecta II, and 3 clubfoot) and 11 had other malformations. So, skeletal dysplasias represented the 15% (13/86) of all FL

while chromosomal disorders are more frequent (19%, 16/86) [26], therefore aneuploidy studies are always advisable.

The interpretation of US finding in non-lethal types is even more difficult. ACH have a normal or close to normal femur length until 20–24 weeks. In our series, none of the fetuses with a suspicion of an ACH were positive. Not surprisingly because antenatal diagnosis is difficult as demonstrated by Modaff *et al.*, in their study of children with ACH. From 28 families without previous family history, 12 of these pregnancies were not recognized to have any fetal abnormalities (43%) and in the other 16 cases various diagnoses were provided but none were given a definitive diagnosis of ACH [27]. Reports of prenatally diagnosed HCH fetuses are very rare. The prenatal sonographic detection of HCH is the most difficult due to the absence of specific US markers because many of the subtle symptoms of the disease are not present *in utero* and infancy [21]. The remarkable deviation of the foetal growth curve of femur length from the normal values in conjunction with a normal growth curve of biparietal diameter has been suggested to be a useful US indication for prenatal non-lethal skeletal dysplasia [28]. In those cases, prenatal diagnosis relies first a karyotype and later on an ACH/HCH molecular study.

In tissue abortion is interesting to have a description of the phenotype of the aborted foetus (phenotype TD-I or TD-II) to design the molecular study. Chromosomal abnormalities are the second cause of foetal anomalies so cytogenetic/molecular studies must be done [29, 30]. The malformations constitute the most frequent indication for termination of pregnancy. This group include different pathologies in which skeletal system is a small percentage variable between 6% and 16% [30–32]. Although most of the TA referred to our laboratory came from private centre with no medical or anatomic record, we have diagnosed 30% of TA (5 skeletal dysplasias and 1 triploidy) from 20 cases. Another abortion without molecular study because of deterioration of the sample, had a pathological anatomy study in our hospital indicated a probable 18 trisomy. So, a total of 7 samples have been diagnosed (35%).

Sporadic cases of ACH and other skeletal dysplasia due to mutations in *FGFR3* gene have been demonstrated that occur in the paternally derived chromosome and associated with advanced paternal age [33, 34]. Wyrobek *et al.* studying gene mutations on DNA in advancing male age male, reported a 3.3% increase in ACH mutation frequency per year age [11]. In our group of positive skeletal dysplasias, there are 9 sporadic cases, 6 of them have a paternal age  $\geq 35$  years (35–43 years), 1 case was 33 years old and in 2 we did not get the information. Due to the high incidence of *de novo* cases, it is recommended high-resolution sonography in weeks 20–22 [10] when the father is older of 35 years old.

Our purpose in this study was to show our experience in molecular studies prenatal diagnosis with suspicion of skeletal dysplasias due to *FGFR3* gene. After a normal karyotype, all exons implicated in the four most common skeletal dysplasias in *FGFR3* gene (ACH, HCH, TD-I, and TD-II) must be studied, obviously starting with the one that phenotype suggests. Molecular diagnosis is always indicated in cases of affected parents, affected son or positive molecular skeletal dysplasias in a previous pregnancy, in both later cases just for anxiety because germ line mosaicism are very rare and have not been reported. A US finding showed hypoplastic thorax with micromelia, above all if the ratio of femur length-to-abdominal circumference  $< 0.16$ , forces to indicate a prenatal diagnosis for molecular study of lethal dysplasias. A protocol for abortion must include an X-ray, pathologic anatomy, and genetic studies. Genetics studies must assess aneuploidy and all known mutations for *FGFR3* gene. There were other skeletal dysplasias with mutations in different genes so it is a best practice to keep a DNA sample for future studies when phenotype suggests another diagnosis and *FGFR3* gene mutations have not been found. Our opinion is that the identification of skeletal dysplasias is quite difficult and requires interdisciplinary cooperation between gynaecology, radiology, pathology and genetics, for a correct diagnosis and therefore providing a better counselling to the parents.

**Acknowledgements** This group is founded by the Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) [ISCIII, Madrid, Spain]. We would like to thank to the Fundación Ramón Areces and INERGEN (FIS PIC03/05; FIS PI05/0263) for its support.

## References

1. Spranger J. Bone dysplasia families. *Pathol Immunopathol Res.* 1988;7:76–80.
2. Keegan K, Johnson DE, Williams LT, Hayman MJ. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, *FGFR3*. *Proc Acad Sci USA.* 1991;88:1095–1099.
3. Keegan K, Rooke L, Hayman M, Spurr NK. The fibroblast growth factor receptor 3 gene (*FGFR3*) is assigned to human chromosome 4. *Cytogenet Cell Genet.* 1993;62:172–175. 12.
4. Vajo Z, Francomano CA, Wilkin DJ. The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasia, Muenke craniosynostosis and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev.* 2000;21:23–39.
5. Orioli IM, Castila EE, Barbosa-Neto JG. The birth prevalence rates for the skeletal dysplasias. *J Med Genet.* 1986;23:328–332.
6. Martínez-Frías ML, Cereijo A, Bermejo E, López M, Sánchez M, Golnalo C. Epidemiological aspects of Mendelian syndromes in a Spanish population sample: I. autosomal dominant malformation syndromes. *Am J Med Genet.* 1991;38:622–625.
7. Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Wilkin DJ, Lachman RS, et al. Thanatophoric dysplasia (types I and II)

- caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet.* 1995;9:321–328.
8. Tavormina PL, Bellus GA, Webster MK, Bamshad MJ, Fraley AE, McIntosh I, et al. A novel skeletal dysplasia with developmental delay and acanthosis nigricans is caused by a Lys650Met mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene. *Am J Hum Genet.* 1999;64:722–731.
  9. Stoll C, Dott B, Roth MP, Alembik Y. Birth prevalence rates of skeletal dysplasias. *Clin Genet.* 1989;35:88–92.
  10. Rolf C, Nieschlag E. Reproductive functions, fertility and genetic risks of ageing men. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109:68–74.
  11. Wyrobeck AJ, Eskenazi B, Young S, Arnheim N, Tieman-Boege I, Jabs EW, et al. Advancing age has different effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies sperm. *Proc Natl Aca Sci USA.* 2006;103:9601–9606.
  12. Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, et al. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature.* 1994;371:252–254.
  13. Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell.* 1994;78:335–342.
  14. Climent C, Lorda I, Urioste M, Gairi JM, Rodriguez JJ, Rubio V. Achondroplasia: estudio molecular de 28 pacientes. *Med Clin.* 1998;110:492–494.
  15. Bellus GA, McIntosh I, Smith EA, Aylsworth AS, Kaitila I, Horton WA, et al. A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nat Genet.* 1995;10:357–359.
  16. Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Schmidt H, Weissenbach J, Maroteaux P, et al. Clinical and genetic heterogeneity of hypochondroplasia. *J Med Genet.* 1996;33:749–752.
  17. Parrilla BV, Leeth EA, Kambich MP, Chilis P, MacGregor S. Antenatal detection of skeletal dysplasias. *J Ultrasound Med.* 2003;22:255–258.
  18. Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn.* 1997;17:1299–1311.
  19. Wapner RJ, Sorokin Y, Thom EA, Jonhson F, Dudley DJ, Spong CT, et al. Single versus weekly courses of antenatal corticosteroids: evaluation of safety and efficacy. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:633–642.
  20. Trujillo-Tiebas MJ, Riveiro R, Queipo A, Vallespin E, Cantalapiedra D, Lorda-Sánchez I, et al. Gene Symbol: FGFR3. *Hum Genet.* 2004;115(4):348.
  21. Karadimas C, Sifakis S, Valsamopoulos P, Makatsoris C, Velissariou V, Nasioulas G, et al. Prenatal diagnosis of hypochondroplasia: report of two cases. *Am J Med Genet Part A.* 2006;140:998–1003.
  22. Gooding HC, Boehm K, Thompson RE, Hadley D, Francomano CA, Bowles BB. Issues surrounding prenatal testing for achondroplasia. *Prenat Diagn.* 2002;22:933–940.
  23. Camera G, Doderio D, De Pascale S. Prenatal diagnosis of thanatophoric dysplasia at 24 weeks. *Am J Med Genet.* 1984;18:39–43.
  24. Elejalde BR, Elejalde MM. Thanatophoric dysplasia: fetal manifestations and prenatal diagnosis. *Am J Med Genet.* 1985;22:669–683.
  25. Chen Ch-P, Chern S-R, Shih J-Ch, Wayseen W, Yeh L-F, Chang T-Y, et al. Prenatal diagnosis and genetic analysis of type I and type II thanatophoric dysplasia. *Prenat Diagn.* 2001;21:89–95.
  26. Todros T, Massarenti I, Gaglioti P, Biolcati G, De Felice C. Fetal short femur length in the second trimester and the outcome of pregnancy. *BJOG.* 2004;111:83–85.
  27. Modaff P, Horton VK, Pauli RM. Errors in the prenatal diagnosis of children with achondroplasia. *Prenat Diagn.* 1996;16:525–530.
  28. Kataoka S, Sawai H, Yamada H, Kanazawa N, Koyama K, Nishimura G, et al. Radiographic and genetic diagnosis of sporadic hypochondroplasia early in the neonatal period. *Prenat Diagn.* 2004;24:45–49.
  29. Ramalho C, Matias A, Brandão O, Montenegro N. Critical evaluation of elective termination of pregnancy in a tertiary fetal medicine center during 43 months: correlation of prenatal diagnosis findings and postmortem examination. *Prenat Diagn.* 2006;26:1084–1088.
  30. Aslan H, Yldirim G, Ongut C, Ceylan Y. Termination of pregnancy for fetal anomaly. *Int J Gynaecol Obstet.* 2007;99:221–224.
  31. Guillem P, Fabre B, Cans C, Robert-Gnansia E, Jouk PS. Trends in elective termination of pregnancy between 1989 and 2000 in French county (the Isère). *Prenat Diagn.* 2003;23:877–883.
  32. Vaknin Z, Ben-Ami I, Reish O, Herman A, Maymon R. Fetal abnormalities leading to termination of singleton pregnancy: the 7-year experience of a single medical center. *Prenat Diagn.* 2006;26:938–943.
  33. Orioli IM, Castilla EE, Scarano G, Mastroiacovo P. Effect of paternal age in achondroplasia, thanatophoric dysplasia, and osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet.* 1995;50:209–217.
  34. Wilkin DJ, Szabo JK, Cameron R, Henderson S, Bellus GA, Mack ML, et al. Mutation in fibroblast growth-factor receptor 3 in sporadic cases of achondroplasia occur exclusively on the paternally derived chromosome. *Am J Hum Genet.* 1998;63:711–716.

## Reply to: comment on Trujillo-Tiebas MJ et al. J Assist Reprod Genet DOI 10.1007/s10815-009-9339-1

Maria José Trujillo-Tiebas · María Fenollar-Cortés ·  
Carmen Ramos-Corrales

Received: 3 November 2009 / Accepted: 23 November 2009 / Published online: 29 December 2009  
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Dear Dr. Dong-Zhi Li,

Firstly, we thank you for the interest with which you have read our article as well as the remarks you have made in response [1]. As you mention, skeletal dysplasias are indeed a very diverse group of pathologies for which ultrasound prenatal diagnosis is a difficult prospect that poses a substantial challenge for professionals. For this reason, our Clinical Genetics Service is made up of a consultation section and both a cytogenetics and molecular laboratory. The aim of our paper was to give an account of our experience over a nine-year period in a GENETICS laboratory while summarizing the laboratory's results in providing molecular diagnosis based on samples coming in from both our own institution as well as other accredited centers. Our intent was to stress the great advantages offered by a comprehensive service which, in addition to molecular diagnosis, provides both genetic counseling and cytogenetic and molecular studies.

In Spain, termination of pregnancy is currently permitted by law until the twenty-second week. One of the causes justifying lawful pregnancy termination is the detection of ultrasound-documented alterations which render the developing fetus inviable as well as those causing severe fetal illness. Our hospitals do not perform pregnancy-termination procedures, and the abortuses received by our service are sent to us by legal institutions specializing in such

operations. All the samples that become part of our studies are the product of fetuses deemed by the law as suitable for such purposes.

The time elapsed between detection and gestation is a limiting factor. It can be assumed that, in the near future, prenatal diagnosis of the most common types of bone dysplasia will be performed by means of a screening process carried out in a timely and cost-effective manner, thus limiting the number of pregnancies terminated because of severe skeletal alterations.

Couples seeking genetic counseling in our center are informed of the risks associated with invasive techniques and the options open to them under Spanish law at the moment they receive information on the most likely diagnosis. Therefore, couples choose to pursue prenatal diagnosis of their pregnancy and then are free to decide whether to continue the pregnancy or not based on the findings of ultrasound testing and genetic studies. Orphanet suggests in genetic counseling for thanatophoric dysplasia that <<Recurrence risk is not significantly increased over that of the general population. Germline mosaicism in healthy parents, although not previously reported, remains a theoretical possibility. Prenatal diagnosis is clinically available, and is reliable both through sonography and through molecular studies>> [2]

Our experience has shown there to be two main types of situations:

- a) Previous pregnancy diagnosed with bone dysplasia: recurrence has been shown to be low prevalent in these pathologies [3] but the risk of repeated mutations may be greater than in the general population since it cannot be proven that no *de novo* mutation in the fetus has occurred [4]. Because it is the patients themselves who defend their right to know, they fund these studies themselves. (This information is not contained in the

---

M. J. Trujillo-Tiebas (✉) · C. Ramos-Corrales  
Department of Genetics, Fundación Jiménez Díaz (CIBERER),  
Madrid, Spain  
e-mail: mjtrujillo@fjd.es

M. Fenollar-Cortés  
Department of Genetics, Servicio de Análisis Clínicos,  
Hospital Clínico San Carlos,  
Predoctoral fellow in Fundación Jiménez Díaz,  
Madrid, Spain



article.) therefore, these individuals take on the risk of losing the fetus, though our center has a low incidence of fetal loss (<1.5% in chorionic villi).

- b) When the time of gestation has surpassed the period during which it is legal to terminate the pregnancy: The study is requested as a part of the pregnancy plan, the perinatal follow-up program, and by virtue of the right of parents to have this information.

Some couples who receive ultrasound prenatal diagnoses without molecular confirmation though having been given previous genetic counseling continue with the pregnancy. Many times, these pregnancies result in other diagnoses (referred to in the article as post-natal diagnosis, such as renal polycystosis, cardiopathy, etc.). Other couples, having gone through a follow-up process adapted to the pathological findings of ultrasound testing, opted to discontinue pregnancy in a lawful manner.

It is true that the article has a typographical error, since the STR markers used in the QF-PCR assay included chromosome 21 rather than chromosome 15. Nonetheless, this information appeared in accurate form in the bibliographical reference [5].

We agree with Dr. Li in that prenatal identification of skeletal dysplasias is quite challenging, and that it would be much more effective if there were interdisciplinary efforts made between all the specialties involved. Complementary

radiological, anatomic pathology, and molecular studies must be made available for there to be conclusive diagnoses. We also believe that conducting a study on abortuses found via ultrasound to have skeletal alterations may assist in expanding the knowledge of these pathologies.

**Acknowledgements** Thanks to Oliver Shaw for his collaboration in the English version of the manuscript and to Fundación Ramón Areces (Ref. 4715/001) for supporting this work.

## References

1. Trujillo-Tiebas MJ, Fenollar-Cortés M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Carrillo Redondo A, Ramos-Corrales C, et al. Prenatal diagnosis of skeletal dysplasia due to FGFR3 gene mutations: a 9-year experience: Prenatal diagnosis in FGFR3 gene. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(8):455–60.
2. <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-Thanatophoric-dysplasia.pdf>.
3. Nattacci F, Baffico M, Cavallari U, Bedeschi MF, Mura I, Paffoni A, et al. Germline mosaicism in achondroplasia detected in sperm DNA of the father of three affected sibs. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(6):784–6.
4. Crow JF. The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet.* 2000;1:40–7.
5. Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn.* 1997;17:1299–311.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Gene

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/gene](http://www.elsevier.com/locate/gene)

## Short Communication

# Ellis-van Creveld syndrome in a fetus with rhizomelia and polydactyly. Report of a case diagnosed by genetic analysis, and correlation with pathological and radiologic findings

Milena Peraita-Ezcurra <sup>a,b</sup>, Mónica Martínez-García <sup>a,b</sup>, Víctor L. Ruiz-Pérez <sup>b,f</sup>,  
 María Eugenia Sánchez-Gutiérrez <sup>g</sup>, María Fenollar-Cortés <sup>d</sup>, Camilo Vélez-Monsalve <sup>a,b</sup>,  
 Carmen Ramos-Corrales <sup>a,b</sup>, Ignacio Pastor <sup>e</sup>, Carlos Santonja <sup>c</sup>, María José Trujillo-Tiebas <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Genética, Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), Madrid, Spain

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

<sup>c</sup> Servicio de Anatomía Patológica, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Sección de Genética Clínica, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

<sup>e</sup> Servicio de Radiología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

<sup>f</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>g</sup> Servicio de Inmunología y Genética, Unidad de Genética y Área de Diagnóstico Prenatal, Hospital Infanta Cristina de Badajoz, Badajoz, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 16 February 2012

Available online xxxxx

## Keywords:

Ellis-van Creveld syndrome

Polydactyly

EVC2 gene

Fetus

Clinico-pathological approach

## ABSTRACT

Ellis-van Creveld syndrome is an autosomal recessive disorder mainly characterized by a disproportionate limb dwarfism, chondroectodermal dysplasia, congenital heart disease, postaxial polydactyly, and dysplastic fingernails and teeth. Only 300 cases have been published worldwide. We report a 21-week fetus with rhizomelia and polydactyly detected. Gross photographs, radiologic studies and pathological study were performed leading to the clinico-pathological suspicion of EvC. DNA from fresh fetal tissue was extracted for sequencing the *EVC* and *EVC2* genes. p.W215X and p.R677X mutations were identified in the *EVC2* gene in the fetal sample. Parental sample analysis showed the p.W215X mutation to be inherited from the mother and the p.R677X mutation from the father. The clinical information is essential not only to arrive at a correct diagnosis in fetuses with pathologic ultrasound findings, but also to offer a proper genetic counseling to the parents and their relatives.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Ellis-van Creveld syndrome (EvC, MIM 225500), first described by Richard Ellis and Simon van Creveld in 1940 (Ellis and van Creveld, 1940), is a very rare autosomal recessive disorder characterized by a disproportionate limb dwarfism, chondroectodermal dysplasia, congenital heart disease, postaxial polydactyly, and dysplastic fingernails and teeth (Varela and Ramos, 1996). Regarding skeletal anomalies, affected individuals manifest short ribs, short limbs, a defect of the lateral aspect of the proximal end of the tibia leading to genu valgum deformity, fusion of the hamate and capitate bones of the wrist and postaxial polydactyly (McKusick et al., 1964). Only 300 cases of EvC

syndrome have been reported worldwide (Ruiz-Perez et al., 2000). The highest prevalence is reported in American Amish, and in Arab populations. The birth prevalence in non-Amish population has been estimated as 7/1,000,000 of live birth.

This condition has been found to be associated with *EVC* and *EVC2* mutations (Ruiz-Perez et al., 2000) both mapping to chromosome 4p16. In most cases, affected individuals with mutations in *EVC* and *EVC2* have the typical spectrum of features and are phenotypically indistinguishable (Valencia et al., 2009). Heterozygous mutations in the *EVC* and *EVC2* genes also cause Weyers acrofacial dysostosis, which is inherited in a dominant autosomal pattern (Ruiz-Perez et al., 2000; Valencia et al., 2009). Borderline intelligence is a non-EvC feature that segregates with the homozygous deletion of *EVC*, *EVC2*, *C4orf6*, and *STK32B* (Temtam et al., 2008). To date, 45 mutations in the *EVC* gene and 51 mutations in the *EVC2* gene have been published in the Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff (<http://www.hgmd.org>); most of them are nonsense mutations.

Prenatal anomalies of Ellis-van Creveld syndrome are usually discovered at 18th gestation week; they include a narrow thorax,

Abbreviation: CVS, Chorionic villi sample; EMQN, European molecular quality network; EvC syndrome, Ellis-van Creveld syndrome; Hh, Hedgehog; QF-PCR, Quantitative fluorescence-polymerase chain reaction; RT - PCR, Real time-polymerase chain reaction; SNP, Single nucleotide polymorphism.

\* Corresponding author at: Avenida Reyes Católicos 2, CP: 28040 Madrid (Spain). Tel.: +34 91 550 48 72/73; fax: +34 91 550 48 49.

E-mail address: [mjtrujillo@fjd.es](mailto:mjtrujillo@fjd.es) (M.J. Trujillo-Tiebas).

0378-1119/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.gene.2012.02.030

Please cite this article as: Peraita-Ezcurra, M., et al., Ellis-van Creveld syndrome in a fetus with rhizomelia and polydactyly. Report of a case diagnosed by genetic analysis, and correlation with pathological and radiologic findings, Gene (2012), doi:10.1016/j.gene.2012.02.030



marked shortening of the long bones, hexadactyly of hands and feet, and cardiac defects.

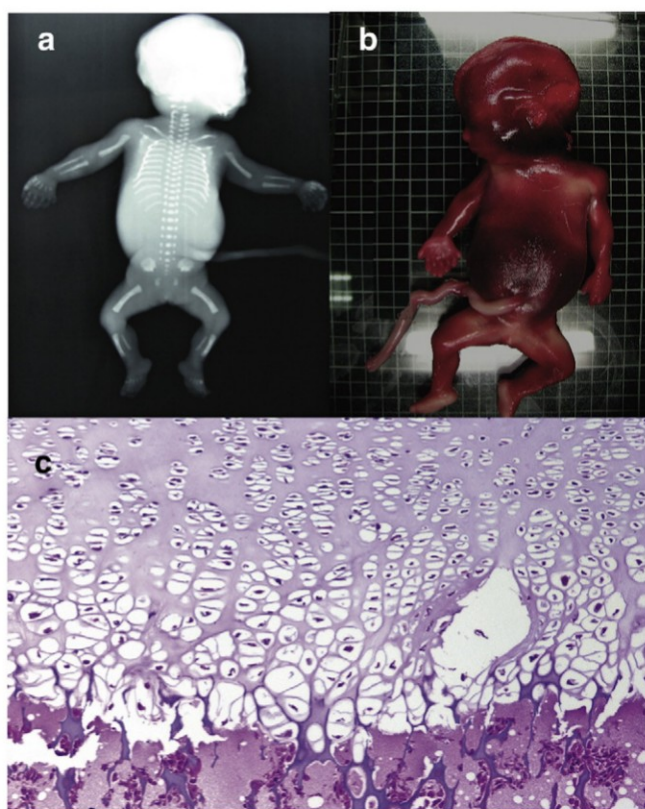
We report a fetus of 21 weeks with rhizomelia and polydactyly detected by routine ultrasound. The final diagnosis of Ellis-van Creveld syndrome was suggested by the pathological and radiologic findings, and was confirmed by sequencing analysis of *EVC* and *EVC2* genes.

## 2. Case report

A female fetus of 21 weeks of gestation was obtained by means of therapeutic abortion from a 32-year-old primigravida due to multiples anomalies detected by ultrasound scan, and was referred to our Genetics Unit and Pathology Department.

Radiographs were taken immediately after delivery, showing shortening and mild bowing of femora and humeri, shortening of the bones of the hands with postaxial polydactyly; small iliac bones with three spurs in the acetabulum; shot ribs with little ossification also seen in the vertebrae; absence of sacral ossification, calcaneus, astragalus and horizontal branches of the pubic bones (this can be due to low fetus weight or the few weeks of gestation) (Fig. 1a).

On gross examination, the female fetus weighed 290 g and her measurements were consistent with 21 weeks (Fig. 1b)). There was minimal frontal and abdominal bulging. No clear-cut shortening of extremities was felt to be present. Both hands featured seven fingers; the left foot had six toes. No teeth were present. On internal organ dissection, no malformations were identified. Histologic examination of femoral, humeral and chondrosternal epiphyseal plates showed a somewhat delayed maturation, with column organization within normal limits (Fig. 1c).



**Fig. 1.** (a) Radiograph showing shortening and mild bowing of femora and humeri, poorly developed iliac bones and polydactyly. (b) This picture shows the female fetus weighed 290 g and with measurements consistent with 21 weeks. There was minimal frontal and abdominal bulging. Both hands featured seven fingers; the left foot had six toes. (c) Histologic examination that shows a chondrosternal epiphyseal plates delayed maturation, with column organization within normal limits.

Fetal tissue was collected fresh in order to perform cytogenetic and molecular assays. Since the tissue culture failed, the karyotype could not be done and we proceeded to reevaluate the case: taking into account the data obtained from pathology and imaging studies, EvC syndrome was the clinical suspicion.

Genomic DNA from fetal tissue was extracted using the tissue extraction kit in the BioRobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Germany) following the recommended protocol. The 21 coding exons of *EVC* and the 22 coding exons of *EVC2* were amplified by using primers published elsewhere (Tompson et al., 2007) and were electrophorised by using ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Two nonsense mutations in *EVC2* were identified in the fetus sample: a p.R677X reported by Valencia et al. in 2009 and a p.W215X not previously described. The p.R677X located in the exon 13 of *EVC2* consists of a nucleotide change of cytosine for thymine in the 2029 position of the cDNA (ref seq NM\_147127.3). The p.W215X is located in exon 5 of the *EVC2* gene and this mutation is the consequence of the nucleotide change of guanine for adenine in the position 645 of the cDNA (ref seq NM\_147127.3).

Subsequently, DNA from parental blood samples was analyzed in order to find out whether the mutations were de novo or inherited. Exons 5 and 13 were both amplified in the parental samples and sequencing was analyzed. The results showed that the p.W215X mutation was inherited from the mother and the p.R677X mutation from the father.

When the parents were contacted to inform them about the results of the genetic study, the woman reported that she was spontaneously pregnant. She was on her 5th week of gestation and a prenatal diagnosis was offered to her. The parents also agreed to participate in a research project about non-invasive prenatal diagnosis, which consists on the analysis of fetal DNA in the maternal plasma in order to exclude the paternal mutation (p.R677X in the *EVC2* gene) in the fetus of the second pregnancy. Therefore, 10 ml of maternal blood was obtained at 9 and 12 weeks of gestation so as to isolate maternal plasma.

A chorionic villi sample (CVS) was obtained at 12 weeks of gestation for conventional prenatal diagnosis. PCR and sequencing analysis of exons 5 and 13 of *EVC2* was done in order to detect the presence or absence of parental mutations. Only the p.W215X maternal mutation was identified in the CVS. Therefore this fetus was not affected with EvC syndrome.

Moreover, QF-PCR was performed with the aim to confirm the fetal origin of the CVS as quality standard recommended by EMQN (European Molecular Quality Network); this technique also allows to discard the most frequent aneuploidies. A fetus with a male normal pattern was observed by this technique.

Non-invasive prenatal diagnosis in maternal plasma was done in parallel. First of all, fetal sex assessment was done by the amplification of the SRY gene by RT-PCR, resulting in a male fetus. The next step was the study of the presence/absence of the paternal mutation by the use of the minisequencing approach previously used by our group. No paternal mutation was detected. It was then decided to use the same minisequencing technology to look for a SNP located on chromosome Y, and therefore confirm the presence of fetal DNA in maternal blood and conclude the absence of the paternal mutation in the fetus.

This molecular study was reviewed and approved by the Ethics Committee of the Fundación Jiménez Díaz and was performed according to the tenets of the Declaration of Helsinki and subsequent revisions (Seoul, 2008).

## 3. Discussion

The cardinal signs of EvC are bilateral postaxial polydactyly of the hands, ectodermal dysplasia, chondrodysplasia resulting in shortness of the long bones, and congenital heart defects (Ellis and van Creveld,



1940; McKusick et al., 1964). Ellis-van Creveld belongs to the short rib-polydactyly group, which is divided into subtypes. The differential diagnosis of EvC with regard to the other subtypes is based on the fact that type I (Saldino Noonan) is frequently associated with intestinal and genital malformations. A preaxial polydactyly with orofacial clefts is common in type II (Majewski). Type III (Verma Naumoff) is similar to type I but there are fewer malformations of inner organs. There is usually an omphalocele in type IV (Beemer Langer) but polydactyly is rare. Other differential diagnoses are achondroplasia, chondrodysplasia punctata, asphyxiating thoracic dystrophy and Morquio syndrome.

Histological study is a source of additional information than can be of diagnostic help. Initially reported was a disturbance of growth within the cartilage reflected by an irregular zone of cartilaginous columns and a reduced number of chondrocytes. Nowadays, standard textbooks of fetal pathology (Yang, 1997) emphasize retardation of the physal growth plates without disorganization, stressing the difference with asphyxiating thoracic dysplasia of Jeune. However, abnormal endochondral ossification and a wide array of histopathologic changes have been described (Guschmann et al., 1999), to some extent depending on the age of the examined fetus and the particular tissues studied (Qureshi et al., 1993). This makes definitive histopathologic diagnosis of EvC syndrome not feasible, so that the clinical, pathologic and radiologic suspicious findings require correlation with molecular studies.

The definitive diagnosis of this syndrome is molecular, based on the analysis of *EVC* and *EVC2* genes by direct sequencing that was the molecular strategy followed in our laboratory. Finally, the fetus was diagnosed as having two nonsense mutations: p.R677X inherited from the father and a p.W215X from the mother that result in a truncated and non-functional protein. The former mutation was previously described (Valencia et al., 2009), but the latter mutation has to our knowledge not been previously reported.

It has been shown that the EVC protein is a component of Hedgehog (Hh) signalling indispensable for normal endochondral growth and that in addition *EVC2* is also required for Hh signal transduction being essential for EVC cilia localization (Blair et al., 2011). Both *EVC* and *EVC2* modulate together Hh signal transduction. Therefore, an *EVC2* non-functional protein causes a defect in the endochondral growth and Ellis-van Creveld syndrome.

Prenatal diagnosis of severe osteochondrodysplasia is usually detected in the second trimester of gestation by ultrasound scan and interruptions are usually followed after a diagnosis of “dwarfism.” The ambiguous term of dwarfism, the overlapping phenotype of many of these diseases and the large genes often associated to them make the genetic approach of these conditions in fetuses not always feasible.

A detailed necropsy and a radiology study might lead to a more concise diagnostic suspicion and might allow a definitive genetic diagnosis.

This combined clinical and molecular approach allowed the Genetics Unit to offer a proper prenatal diagnosis in a further gestation,

as well as genetic counseling. This work was possible thanks to a tight cooperation among different specialists who evaluated all the clinical information as it was gathered.

In conclusion, collecting essential clinical information is crucial not only for making a diagnosis in the fetuses, as shown in this case, but also to offer a proper genetic counseling to the couple and their relatives.

#### Conflict of interest

None to report.

#### Acknowledgments

We especially thank Enrique Galán and Rocío Cordero Merlo for their contribution to this work, Oliver Shaw of Fundación Jiménez Díaz-Capio, Madrid, for his kind help with the English grammar and substantial revision of the manuscript and to the Radiology Department of Fundación Jiménez Díaz-Capio, Madrid. Mónica Martínez-García is sponsored by Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz. This work has been sponsored by Fundación Ramón Areces (4715/001) and CIBERER from the Instituto de Salud Carlos III (06/07/0036).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.gene.2012.02.030](https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.02.030).

#### References

- Blair, H.J., et al., 2011. Evc2 is a positive modulator of Hedgehog signalling that interacts with EvC at the cilia membrane and is also found in the nucleus. *BMC Biol.* 9, 14.
- Ellis, R.W.B., van Creveld, S., 1940. A syndrome characterized by ectodermal dysplasia, polydactyly, chondrodysplasia, and congenital morbus cordis: report of three cases. *Arch. Dis. Child.* 5, 65.
- Guschmann, M., Horn, D., Gasiorek-Wiens, A., Urban, M., Kunze, J., Vogel, M., 1999. Ellis-van Creveld syndrome: examination at 15 weeks' gestation. *Prenat. Diagn.* 19, 879–883.
- McKusick, V., Egeland, J., Eldridge, R., Krusen, D., 1964. Dwarfism in the Amish I. The Ellis-van Creveld syndrome. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 115, 306–336.
- Qureshi, F., Jacques, S.M., Evans, M.I., Johnson, M.P., Isada, N.B., Yang, S.S., 1993. Skeletal histopathology in fetuses with chondroectodermal dysplasia (Ellis-van Creveld syndrome). *Am. J. Med. Genet.* 45 (4), 471–476.
- Ruiz-Perez, V.L., et al., 2000. Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodermal dysostosis. *Nat. Genet.* 24, 283–286.
- Temtamy, S.A., et al., 2008. L1-mediated deletion of *EVC*, *EVC2*, *C4ORF6* and *STK32 B* in Ellis-Van Creveld syndrome with borderline intelligence. *Hum. Mutat.* 29, 931–938.
- Tompson, S., et al., 2007. Sequencing *EVC* and *EVC2* identifies mutations in two-thirds of Ellis-van Creveld syndrome patients. *Hum. Genet.* 120, 663–670.
- Valencia, M., et al., 2009. Widening the mutation spectrum of *EVC* and *EVC2*: ectopic expression of Weyer variants in NIH 3T3 fibroblasts disrupts Hedgehog signaling. *Hum. Mutat.* 30 (12), 1667–1675.
- Varela, M., Ramos, C., 1996. Chondroectodermal dysplasia (Ellis-van Creveld syndrome): a case report. *Eur. J. Orthod.* 18, 313–318.
- Yang, S.S., 1997. Skeletal system: osteochondrodysplasias and dysostoses. In: Gilbert-Barnes, E. (Ed.), *Potter's Pathology of the Fetus and Infant*, Vol. 2. Mosby-Year Book, St Louis, Mo, pp. 1423–1478.



# Paternal Isodisomy of Chromosome 5 in a Patient With Recessive Multiple Epiphyseal Dysplasia

Mónica Martínez García,<sup>1,2</sup> Camilo Velez,<sup>1,2</sup> María Fenollar-Cortés,<sup>3</sup> Ana Bustamante,<sup>1,2</sup> Isabel Lorda-Sanchez,<sup>1,2</sup> Leandro Soriano-Guillén,<sup>4</sup> and María-José Trujillo-Tiebas<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Genética del Hospital Fundación Jiménez Díaz de Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

<sup>3</sup>Sección de Genética Clínica, Servicio de Análisis Clínicos en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Servicio de Pediatría del Hospital Fundación Jiménez Díaz de Madrid, Madrid, Spain

Manuscript Received: 26 August 2013; Manuscript Accepted: 6 November 2013

## TO THE EDITOR:

Autosomal recessive multiple epiphyseal dysplasia (EDM4/rMED) is characterized by childhood-onset joint pain at hips and knees, mild brachydactyly, mildly shortened or normal stature and congenital clubfoot in some cases [Ballhausen et al., 2003]. This disorder belongs to an age-dependent clinically variable group of skeletal disorders known as *SLC26A2*-related chondrodysplasias which span from lethal achondrogenesis type 1B (ACG1B) and atelosteogenesis type 2 (AO2) to classical diastrophic dysplasia (cDTD) and recessive multiple epiphyseal dysplasia (EDM4/rMED). Mutations in the *SLC26A2* gene (locus 5q32–q33.1) have been documented in all of these phenotypes.

The four most common *SLC26A2* mutations, which account for 70% of disease alleles (66% in DTD cases and 90% in EDM4/rMED cases) are: p.Arg279Trp which is the most common mutation in non-Finnish patients [Superti-Furga et al., 1999], c.-26+2T>C (also known as “Finnish allele”), p.Arg178Ter and p.Cys653Ser [Bonafé et al., 2008]. The *SLC26A2* gene encodes a sulfate transporter that consists of a 5' untranslated exon with regulatory functions and two coding exons that play a crucial role for the uptake of inorganic sulfate into chondrocytes in order to maintain adequate levels of intracellular sulfate and allow proper sulfation of the proteoglycans [Forlino et al., 2005]. The sulfated proteoglycans and cartilage-specific collagens are the major components of extracellular matrix, and their properties are essential for the biological functions of cartilage, playing an essential role in growth and maintenance of animal skeletal systems [Satoh et al., 1998].

We report on a patient with recessive multiple epiphyseal dysplasia and a homozygous *SLC26A2* mutant allele derived from paternal isodisomy. To the best of our knowledge, this is the first case of recessive multiple epiphyseal dysplasia due to uniparental disomy (UPD), and the second reported example of paternal UPD of chromosome 5 [Seal et al., 2006].

A fetus at 20 weeks of gestation showed a discrepancy in the fetal measurements with significant shortness of limbs (<5th centile) and increased nuchal translucency (>6 mm), during the routine ultrasound examination of a 34-year-old primigravida, with unremarkable family history. A DNA sample was obtained from fetal

## How to Cite this Article:

Martínez García M, Velez C, Fenollar-Cortés M, Bustamante A, Lorda-Sanchez I, Soriano-Guillén L, Trujillo-Tiebas M-J. 2014. Paternal isodisomy of chromosome 5 in a patient with recessive multiple epiphyseal dysplasia. *Am J Med Genet Part A* 9999:1–4.

amniotic fluid. The karyotype showed normal 46, XX result. Also, the most frequent mutation involved in skeletal dysplasias, the p. Gly380Arg mutation in the *FGFR3* gene, was absent. Molecular testing of skeletal dysplasias was performed using CGC array (CircaGen), and the p.Arg279Trp mutation of the *SLC26A2* gene was identified in a homozygous pattern (Fig. 1).

Sonographic reevaluation of the fetus at 29 weeks of gestation showed shortness of limbs, polyhydramnios, and a decreased thoracic circumference. Considering the ultrasound findings and mutated gene, ACG1B was the first clinical candidate [Siegrist et al., 2011]. The fetus was born normally at 38 weeks of gestation with a birth weight of 3 kg (50th centile), length of 47 cm (10th–25th centile) and a head circumference of 36 cm (75th–90th centile). At that time, the only relevant finding was a right clubfoot.

DNA samples were prepared from peripheral blood of the patient and her parents. The previously identified mutation was

Conflict of Interest: none to declare.

Grant sponsor: Fundación Conchita Rábago de Jimenez Diaz;

Grant sponsor: Fundación Ramon Areces; Grant number: 4715/001.

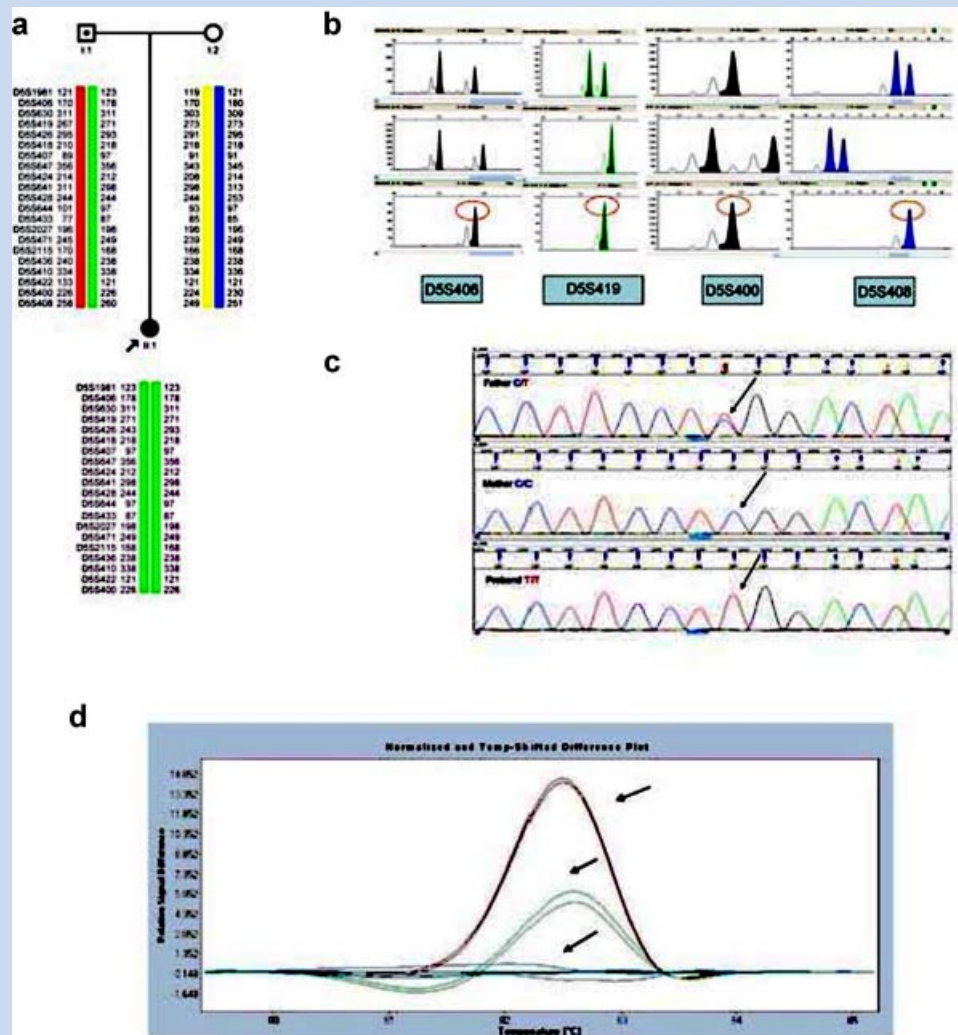
\*Correspondence to:

Dr. María-José Trujillo-Tiebas, Avenida Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain.

E-mail: mjtrujillo@fjd.es

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 00 Month 2014

DOI 10.1002/ajmg.a.36378



**FIG. 1.** a: Haplotype analysis using 21 STRs located along the chromosome 5. b: Electropherogram amplification patterns of 4 of those STRs located in chromosome 5 (D5S406, D5S419, D5S400, and D5S408) using DNAs from the father's (above), mother's (middle) and child's samples (below), showing the paternal allele and the loss of maternal allele in the child's sample for each STR. c: c.835C>T; p.Arg279Trp of the *SLC26A2* gene in the three samples. d: High resolution Melting showing three different patterns (paternal, maternal, and child's samples).

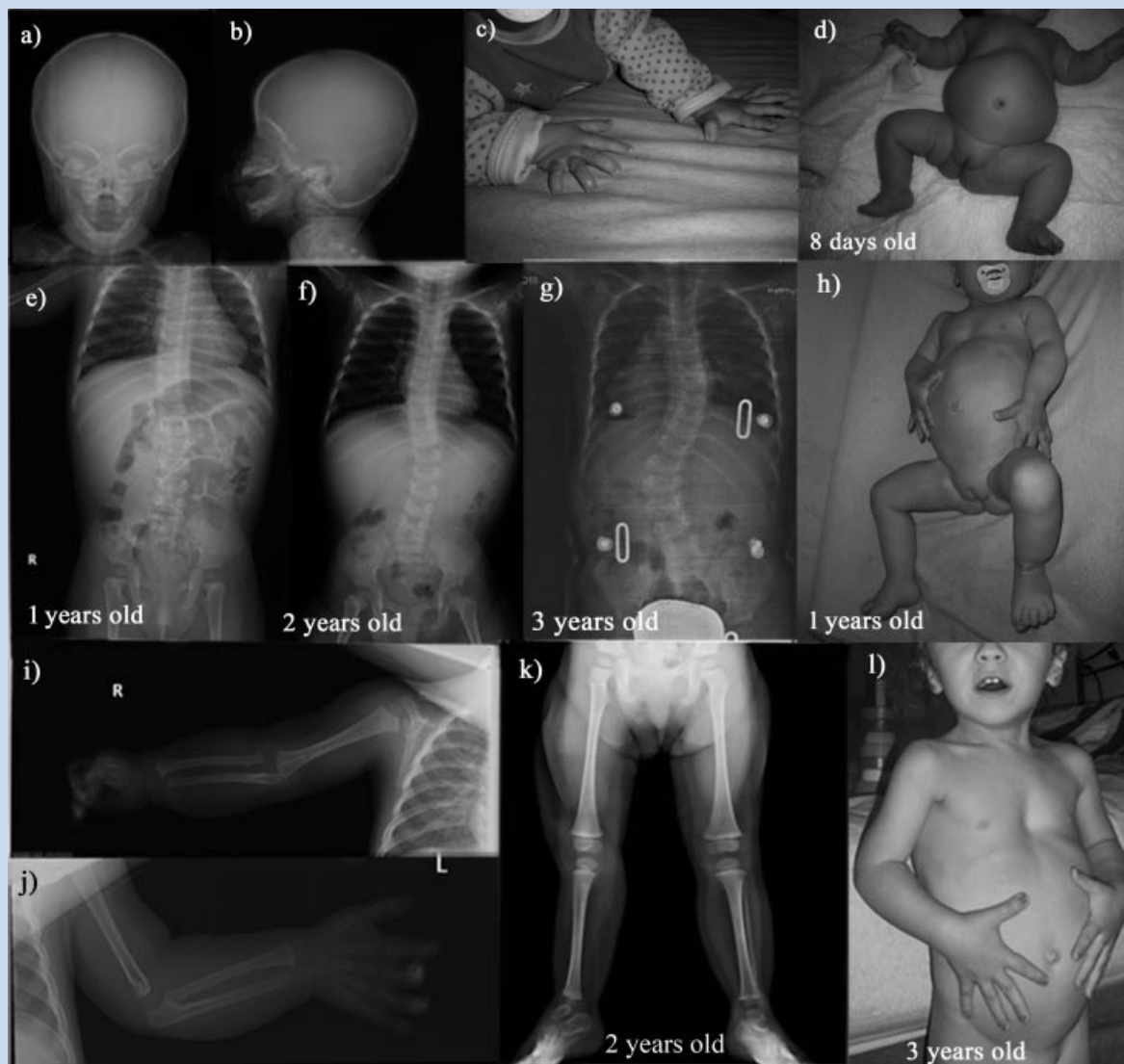
resequenced in our lab as an internal control, and then, evaluated in her parents. The father showed the mutation in a heterozygous pattern, whereas the maternal sample had a normal gene sequence. Since the child was a homozygous, three hypotheses were postulated: (1) A maternal deletion; (2) uniparental disomy; (3) failure of amplification of the maternal allele.

The first hypothesis was considered most likely; therefore high resolution melting analysis was performed in order to determine the genetic doses of the maternal sample. The three analyzed samples showed normal doses of the gene and the melting curves had three different patterns (Fig. 1). Haplotype analysis of 21 highly heterozygous microsatellite markers spanning chromosome 5 (Linkage Mapping Set v.2.5; Applied Biosystems, Foster city, CA) was performed (Fig. 1). The child was a homozygous for all the markers and lacked each corresponding maternal marker, so complete paternal isodisomy 5 was documented.

Neonatally the child was diagnosed with bilateral renal duplication and ostium secundum atrial septal defect. Global hypotonia became evident and she was enrolled in early rehabilitation. Follow-up at 10 and 16 months showed a shortness of limbs with a rhizomelic predominance and moderate occipital plagiocephaly (Fig. 2). Hypotonia persisted and motor development was delayed (sitting at 15 months, standing at 16 months; vocalization is non-referential and bisyllabic). Radiographic examination at 1 year-old showed: mild plagiocephaly, enlarged eye sockets, dorsolumbar scoliosis, rhizomelic upper limb shortness, a decrease in the carpal angle and shortness of the fibula (Fig. 2).

Bonafé et al. [2010] reported that half of EDM4/rMED with findings at birth are suspected of having a skeletal dysplasia as in this case. Considering the ultrasound scan findings and the mutated gene, ACG1B was initially considered the most likely phenotype. However, as the severity of the clinical signs decreased in infancy,





**FIG. 2.** Radiographic images of: [a,b] the skull; [e–g] the thorax and abdomen showing a progression in the dorsolumbar scoliosis over the years; [i,j] the arms showing the a bilateral rhizomelic upper limb shortness and a decrease in the carpal angle [k] of the lower limbs. Clinical Phenotype photograph of [c] the hands; and of the patient at different ages: [d] 8 days old, [h] 1 year old, [i] 3 years old.

the mildest phenotypes such as cDTD or EDM4/rMED were reconsidered. The *SLC26A2* p.Arg279Trp mutation has been reported as a mild variant correlated with the EDM4/rMED phenotype in Portuguese patients [Barbosa et al., 2011]. The evolution of the clinical signs, the X-ray evaluation, the appropriate molecular diagnosis (ruling out the possible deletion of the maternal allele), and the report of the homozygous p.Arg279Trp variant as a “mild” mutation that causes the EDM4/rMED phenotype, led to the clinical diagnosis of EDM4/rMED.

UPD is a rare but important cause of autosomal recessive disorders, with significant implications for mutation screening and genetic counseling. There have been over 35 reported cases of recessive diseases resulting from UPD [Kotzot and Utermann, 2005], although only two involved chromosome 5,

being of paternal origin. Only one was a complete isodisomy; the other one was a segmental isodisomy [Quan et al., 1997; Fassihi et al., 2006]. Finding this paternal isodisomy strongly suggests that paternally derived genes on HSA5 are not imprinted.

Almost 40 genes on the HSA5 are associated with several human conditions including schizophrenia, breast cancer, Parkinson disease [Lapunzina and Monk, 2011]. Several genes close to *SLC45A2* with a role in bone metabolism could modify her skeletal manifestations, such as *PDLIM4* (5q31.1) involved in susceptibility to osteoporosis; *MSX2* (5q35.2) responsible for a type II of craniosynostosis; *NSD1* (5q35.2–q35.3); *FGFR4* (5q35) mutations causing many skeletal features; *SQSTM1* (5q35.3) gene responsible for the Paget disease of bone (PDB), among others.

Three essential clinical lessons emerged from the molecular analysis performed in this family:

1. The clinical diagnosis of the proposita changed from lethal phenotype (ACG1B) to a milder phenotype (rMED).
2. A change of the genetic counseling from a 25% risk of recurrence as a recessive disorder to practically null risk for offspring, due to isodisomy of chromosome 5 identified.
3. This proposita should be followed in the context of the condition, but also for the possibility of other recessive disorders during lifetime.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patient's parents for helping us compiling this report. We would like also to thank Rosa Riveiro for her contributions to this work. Monica Martinez-Garcia was sponsored by Fundación Conchita Rábago de Jimenez Diaz. This work had been sponsored by Fundación Ramon Areces (4715/001).

## REFERENCES

- Ballhausen D, Bonafé L, Terhal P, Unger SL, Bellus G, Classen M, Hamel BC, Spranger J, Zabel B, Cohn DH, Cole WG, Hecht JT, Superti-Furga A. 2003. Recessive multiple epiphyseal dysplasia (rMED): Phenotype delineation in eighteen homozygotes for DTDST mutation R279W. *J Med Genet* 40:65–71.
- Barbosa M, Sousa A, Medeira A, Lourenço T, Saraiva J, Pinto-Basto J, Soares G, Fortuna A, Superti-Furga A, Mittaz L, Reis-Lima M, Bonafé L. 2011. Clinical and molecular characterization of diastrophic dysplasia in the Portuguese population. *Clin Genet* 80:550–557.
- Bonafé L, Hästbacka J, De la Chapelle A, Campos-Xavier A, Chiesa C, Forlino A, Superti-Furga A, Rossi A. 2008. A novel mutation in the sulfate transporter gene SLC26A2 (DTDST) specific to the Finnish population causes de la Chapelle dysplasia. *J Med Genet* 45:827–831.
- Bonafé L, Mittaz-Crettol L, Ballhausen D, Ballhausen D, Superti-Furga A. 2010. Multiple epiphyseal dysplasia, recessive—GeneReviews™—NCBI Bookshelf. [Updated 2010 Mar 18]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, editors. Seattle: University of Washington; 1993. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1306/>. pp 1–11.
- Fassihi H, Lu L, Wessagowit V, Ozoemena LC, Jones CA, Dopping-Hepenstal PJC, Foster L, Atherton DJ, Mellerio JE, McGrath JA. 2006. Complete maternal isodisomy of chromosome 3 in a child with recessive dystrophic epidermolysis bullosa but no other phenotypic abnormalities. *J Invest Dermatol* 126:2039–2043.
- Forlino A, Piazza R, Tiveron C, Della Torre S, Tatangelo L, Bonafé L, Gualeni B, Romano A, Pecora F, Superti-Furga A, Cetta G, Rossi A. 2005. A diastrophic dysplasia sulfate transporter (SLC26A2) mutant mouse: Morphological and biochemical characterization of the resulting chondrodysplasia phenotype. *Hum Mol Genet* 14:859–871.
- Kotzot D, Utermann G. 2005. Uniparental disomy (UPD) other than 15: Phenotypes and bibliography updated. *Am J Med Genet Part A* 136A: 287–305.
- Lapunzina P, Monk D. 2011. The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer. Biology of the cell/under the auspices of the European Cell Biology Organization. *Biol Cell* 103:303–317.
- Quan F, Janas J, Toth-fejel S, Johnson DB, Wolford JK, Popovich BW. 1997. Uniparental disomy of the entire X chromosome in duchenne muscular dystrophy female with duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 60:160–165.
- Satoh H, Susaki M, Shukunami C, Iyama K, Negoro T, Hiraki Y. 1998. Functional analysis of diastrophic dysplasia sulfate transporter. Its involvement in growth regulation of chondrocytes mediated by sulfated proteoglycans. *J Biol Chem* 273:12307–12315.
- Seal JL, Gornick MC, Gogtay N, Shaw P, Greenstein DK, Coffey M, Gochman PA, Stromberg T, Chen Z, Merriman B, Nelson SF, Brooks J, Arepalli S, Wavrant-De Vrièze F, Hardy J, Rapoport JL, Addington AM. 2006. Segmental uniparental isodisomy on 5q32-qter in a patient with childhood-onset schizophrenia. *J Med Genet* 43:887–892.
- Siegrist J, Bravo C, Antolín E, De León JA, Gámez F, Pérez R. 2011. Malformaciones esqueléticas: Diagnóstico ecográfico y resultados perinatales. *Diagnóstico Prenat* 22:7–13.
- Superti-Furga A, Neumann L, Riebel T, Eich G, Steinmann B, Spranger J, Kunze J. 1999. Recessively inherited multiple epiphyseal dysplasia with normal stature, club foot, and double layered patella caused by a DTDST mutation. *J Med Genet* 36:621–624.



## CARTA CIENTÍFICA

**El diagnóstico clínico-molecular en la hipoplasia de cartilago-pelo: dos nuevos casos****Clinical and molecular diagnostics of a cartilage-hair hypoplasia: Two new cases***Sr. Editor:*

El diagnóstico de la hipoplasia de cartilago-pelo o condrodisplasia metafisaria tipo McKusick (MIM 250250), se establece por talla baja disarmónica, fémur y tibia incurvados, falanges cortas y engrosadas, laxitud de ligamentos con característica limitación a la extensión de los codos y pelo ralo, inicialmente descrito en población amish estadounidense<sup>1</sup>. Es debido a mutaciones en el gen *RMRP* (MIM 157660; 9p13)<sup>2</sup>: gen nuclear no codificante que transcribe para una cadena de ARN que forma parte del complejo mitocondrial-RNasa-RMP participando en el ensamblaje de los ribosomas y en la progresión del ciclo celular. Con patrón de herencia recesiva, la severidad de las mutaciones da lugar a una clínica muy variada (de más leve a más grave): displasia metafisaria sin hipotricosis, hipoplasia de cartilago-pelo y displasia anauxética<sup>3</sup>.

**Caso 1**

Varón de 7 meses, de padres sanos no consanguíneos españoles. Nació a las 40 semanas con 3.200 g, 45 cm y PC de 36 cm. Ingresó a los 4 meses por gastroenteritis aguda. A la exploración presenta pelo ralo, escaso y frágil, acortamiento de extremidades y fémures algo incurvados en varo, manos con dedos cortos. Talla 65,5 cm (−1,31 DE) y peso 7.850 g (−0,72 DE). Estudio óseo: acortamiento de los huesos largos y ensanchamiento metafisario. Estudio inmunitario: leucopenia con neutropenia moderada y linfopenia (linfocitos T CD4 y B+ disminuidos); niveles disminuidos de IgA siendo normales los de IgM e IgG. Con estos datos se le diagnosticó clínicamente de hipoplasia de pelo-cartilago. A la edad de 3 años se solicita el estudio del gen *RMRP* revelando la presencia de 2 mutaciones en heterocigosis [g.236A > G, paterno; g.260G > A, materno]. Este diagnóstico permitió el desarrollo de una sonda para detectar la mutación paterna en el ADN fetal en sangre materna (técnica prenatal no invasiva)

a las semanas de gestación 8 y 10 en 2 gestaciones posteriores de esta pareja. En la primera gestación se detectó la mutación paterna en el ADN fetal en sangre materna confirmado por amniocentesis (técnica invasiva) resultando el feto afecto. Se decidió la interrupción del embarazo. En la segunda gestación no se detectó la mutación paterna y el estudio prenatal invasivo lo confirmó (feto sano no portador; publicación en proceso). A los 9 años continúa con talla baja (108 cm, [−4,06 DE], peso 20 kg [−2,25 DE]), incurvamiento en varo de las extremidades moderada con seguimiento en rehabilitación. Pelo ralo. Ha presentado 2 neumonías sin identificación de gérmenes. Está correctamente vacunado según el calendario de su comunidad, presentando reacciones febriles leves con las vacunas de virus vivos. Toma trimetoprim sulfametoxazol de manera profiláctica 3 días en semana (fig. 1).

**Caso 2**

Varón de 2,3 años de origen rumano, con el diagnóstico de acondroplasia desde la semana de vida. Embarazo fruto de padres no consanguíneos controlado en Rumania, parto a término del que se desconocen los datos antropométricos. A la exploración presenta una talla de 62 cm (−9,6 DE), peso de 8.620 g (−3,34 DE), acortamiento de extremidades superiores e inferiores, manos toscas y dedos cortos. No deformidad craneal con escasa cantidad de pelo, muy fino y rubio. Estudio óseo: huesos de las manos cortos con metáfisis en copa, rodillas con metáfisis anchas e irregulares y epífisis poco osificadas, incurvación de los fémures con retraso en la osificación de la epífisis femoral proximal, caderas con acetábulos normales (fig. 1). Se realiza estudio analítico (hemograma, bioquímica e inmunoglobulinas) con normalidad de los parámetros estudiados. A los 7,4 años presenta 90,6 cm (−6,2 DE), velocidad de crecimiento de entre 4 y 7 cm al año (−2,1 DE y −1,4 DE), no ha padecido ninguna infección grave ni cuadro de malabsorción intestinal. Se solicita estudio directo del gen *RMRP* donde se observan 2 mutaciones en heterocigosis [g.96.97dupTG, materno; g.-25-11 dupACTACTCTGTGAAGC]. El padre no colabora (fig. 1).

Las mutaciones encontradas en estos 2 casos han sido descritas previamente en pacientes con fenotipo de hipoplasia cartilago-pelo de origen europeo<sup>4</sup>. La mutación g.-25-11 dupACTACTCTGTGAAGC del paciente rumano está descrita en un paciente de origen español<sup>5</sup>. El diagnóstico

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2014.12.008>

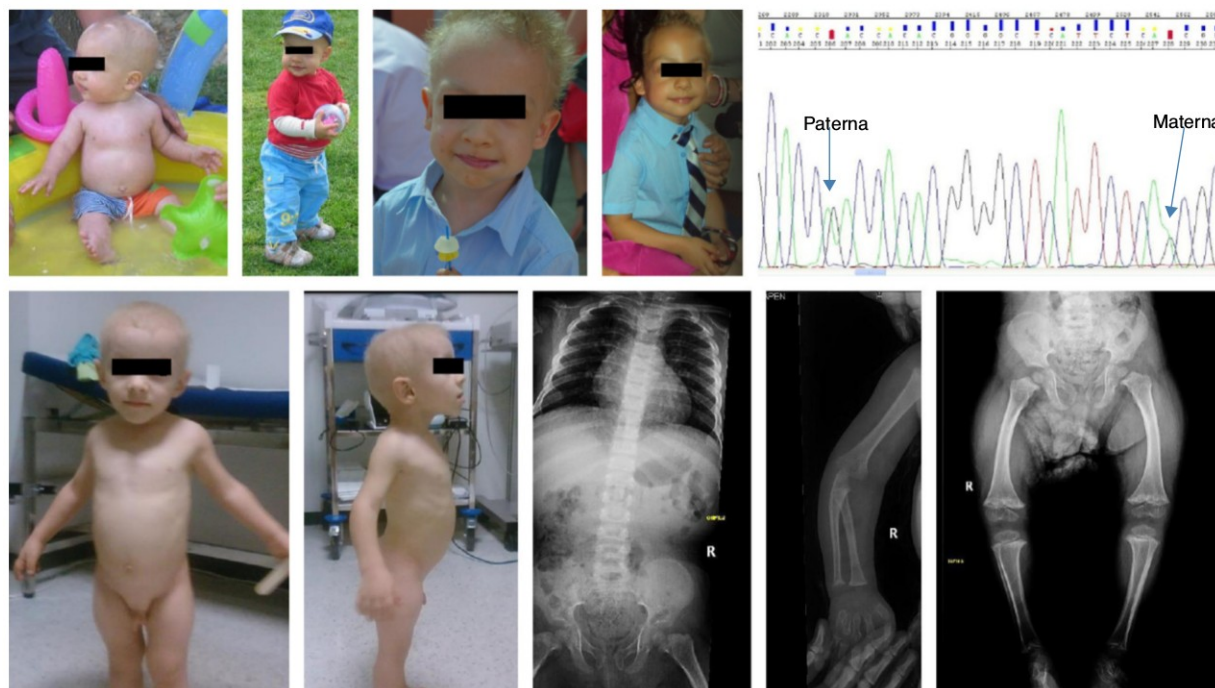
1695-4033/© 2014 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Tabla 1 Diagnóstico diferencial de la hipoplasia de pelo-cartilago

	Hipoplasia de pelo cartilago	Displasia cifomélica	Displasia inmuno ósea tipo Schimke	Síndrome de Omenn	Displasia esquelética con inmunodeficiencia combinada severa	Síndrome de Shwachman-Diamond
MIM	250250	211350	242900	603554	200900	260400
Gen	<i>RMRP</i>	Desconocido	<i>SMARCA1</i>	<i>DCLRE1C, RAG1, RAG2</i>	Desconocido	<i>SBDS</i>
Localización	9p13	Desconocido	2q35	11p12,10'13	Desconocido	7q11
Herencia	AR	AR	AR	AR	AR	AR
Alt. esq	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
Tipo	Metafisaria	Metafisaria	Espondiloepifisaria	—	Metafisaria	Metafisaria
Fémur y tibia incurvados	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
Talla baja	POS	POS	POS	NEG	POS	POS
	Desproporcionada	Desproporcionada	Desproporcionada	Fracaso del desarrollo	Desproporcionada	
Alt. hemato	POS	NEG	POS	POS	POS	POS
Tipo	Linfopenia, neutropenia, riesgo malignidad		Linfopenia, neutropenia, trombocitopenia	Eosinofilia, trombocitopenia	Linfopenia	Pancitopenia, riesgo malignidad
Anemia	Frecuente	NEG	POS	POS	NEG	POS
Pelo	Ralo, cejas y pestañas escasas y rubias	Normal	Fino	Alopecia	Normal	Normal
Alt. inmuno	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG
Tipo	↓Cél T y B		↓Cél T	Linfoadenopatía, nódulos linfáticos desestructurados, ↓Cél B	Agammaglobulinemia, hipoplasia de timo	
Alt. gastro	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
Tipo	Malabsorción intestinal, enfermedad de Hirschprung, atresia esofágica					Insuficiencia pancreática exocrina
Alt. renal	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
Tipo			Nefropatía progresiva, rápida y fatal			
Retraso mental	NEG	NEG	NEG pero descrito	NEG	DESCONOCIDO	POS
Esperanza de vida	Adulto	Adulto	Infancia	Infancia	Lactante	Adulto

Alt.: alteración; AR: autosómica recesiva; NEG: negativo; POS: positivo.





**Figura 1** Parte superior: paciente del caso 1 a los 9 y 18 meses, y a los 5 y 7 años, respectivamente. Mutaciones encontradas en el gen RMRP. Parte inferior: paciente del caso 2 a los 4,5 años de edad e imágenes radiológicas a los 2 años de edad.

diferencial se contempla en la [tabla 1](#). Un diagnóstico completo, tanto clínico como molecular, permite predecir y realizar un mejor seguimiento de la enfermedad. Se ha de estudiar la función inmunológica tanto humoral (déficit de IgG) como celular (linfopenia), así como la presencia de anemia macrocítica no regenerativa. Además, pueden asociar neoplasias, principalmente de origen hematológico (linfomas y leucemia)<sup>6</sup>. Las opciones terapéuticas contemplan las osteotomías para corregir deformidades, el alargamiento óseo, el tratamiento de las infecciones con profilaxis de las mismas si existe inmunodeficiencia y de la anemia si aparece. El diagnóstico molecular permite un adecuado consejo genético tanto familiar como reproductivo.

## Agradecimientos

Expresamos nuestro agradecimiento a los técnicos de laboratorio, D. Jesús Gallego Merlo y D. Camilo Vélez Monsalve por su buen hacer diario y su aportación al diagnóstico de estos 2 casos. Agradecemos a los pacientes y sus familiares el permiso dado para publicar las imágenes y datos clínicos con un objetivo exclusivamente científico.

## Bibliografía

- McKusick VA, Eldridge R, Hostetler JA, Ruangwitt U, Egeland JA. Dwarfism in the Amish. II. Cartilage-hair hypoplasia. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1965;116:285-326.
- Sulisalo T, Klockars J, Makitie O, Francomano CA, de la Chapelle A, Kaitila I, et al. High-resolution linkage-disequilibrium mapping of the cartilage-hair hypoplasia gene. *Am J Human Genet.* 1994;55:937-45.

- Thiel CR, Horn D, Zabel B, Ekici AB, Salinas K, Gebhart E, et al. Severely uncapacitating mutations in patients with extreme short stature identify RNA-processing endoribonuclease RMRP as essential cell growth regulator. *Am J Hum Genet.* 2005;77:795-806.
- Thiel CT, Rauch A. The molecular basis of the cartilage-hair hypoplasia-anaxetic dysplasia spectrum. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:131-42.
- Muñoz-Robles J, Allende LM, Clemente J, Calleja S, Varela P, González L, et al. A novel RMRP mutation in a Spanish patient with cartilage-hair hypoplasia. *Immunobiology.* 2006;211:753-7.
- Taskinen M, Ranki A, Pukkala E, Jalkanen L, Kaitila I, Makitie O. Extended follow-up of the Finnish cartilage-hair hypoplasia cohort confirms high incidence of non-Hodgkin lymphoma and basal cell carcinoma. *Am J Hum Genet.* 2005;77:795-806.

M. Fenollar-Cortés<sup>a,b,\*</sup>, E. Lara-Orejas<sup>c</sup>, A. González-Meneses<sup>d</sup>, J.L. Ruibal-Francisco<sup>c</sup> y M.J. Trujillo-Tiebas<sup>b,e</sup>

<sup>a</sup> Sección de Genética Clínica, Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

<sup>b</sup> Servicio de Genética, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

<sup>c</sup> Departamento de Pediatría, Hospital Infanta Cristina, Parla, Madrid, España

<sup>d</sup> Unidad de Dismorfología, Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España

<sup>e</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [mariadelmar.fenollar@salud.madrid.org](mailto:mariadelmar.fenollar@salud.madrid.org) (M. Fenollar-Cortés).

